

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CELLEN GIACOMELLI GROTH LUIZ

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA ALIMENTAR DO EXTRATO DE FRUTOS DO
Jaracatia spinosa: ENSAIOS TOXICOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS**



CURITIBA
2016

Programa de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional
Universidade Federal do Paraná – UFPR

CELLEN GIACOMELLI GROTH LUIZ

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA ALIMENTAR DO EXTRATO DE FRUTOS DO
Jaracatiá spinosa: ENSAIOS TOXICOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de mestre em Segurança
Alimentar e Nutricional, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sila Mary Rodrigues Ferreira
Coorientadora: Prof^a Dr^a Mônica de Caldas Rosa
dos Anjos.

CURITIBA
2016

Luiz, Cellen Giacomelli Groth
Avaliação da segurança alimentar do extrato de frutos do *Jaracatiá spinosa*: ensaios toxicológicos em camundongos / Cellen Giacomelli Groth Luiz – Curitiba, 2016.
90 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Sila Mary Rodrigues Ferreira
Coorientadora: Professora Dra. Mônica de Caldas Rosa dos Anjos
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Jaracatiá spinosa*. 2. Testes de toxicidade. 3. Ensaio agudo. 4. Ensaio subcrônico. I. Ferreira, Sila Mary Rodrigues. II. Anjos, Mônica de Caldas Rosa dos. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.46



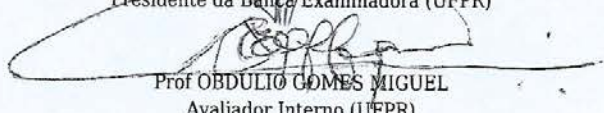
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós Graduação em ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO
Código CAPES: 40001016074P7

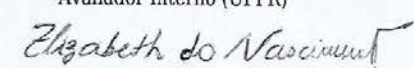
ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO

No dia vinte e seis de julho de dois mil e dezesseis às 14:00 horas, na sala Auditório Maurício Bissoli, Av. Prof. Lothário Meissner, 632, do Setor de CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **CELLEN GIACOMELLI GROTH LUIZ** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada: "**Avaliação da Segurança Alimentar do extrato de frutos do *Jaracatiá Spinosa*: ensaios toxicológicos em camundongos.**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: SILA MARY RODRIGUES FERREIRA (UFPR), ELIZABETH DO NASCIMENTO (UFPE), OBDULIO GOMES MIGUEL (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, SILA MARY RODRIGUES FERREIRA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 26 de Julho de 2016.


Prof SILA MARY RODRIGUES-FERREIRA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


Prof OBDULIO GOMES MIGUEL
Avaliador Interno (UFPR)


Prof ELIZABETH DO NASCIMENTO
Avaliador Externo (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Passados dois anos vejo o quanto estou diferente, uma experiência nova e desafiadora.

Agradeço a Deus, minha fortaleza e minha força, quem perfeitamente desembaraça meus caminhos (II Reis 33:22). Minha gratidão por estar no comando e providenciar todos os recursos e pessoas que estiveram ao meu lado nessa caminhada.

À minha mãe preciosa, pela vida, pela paciência, pelo incentivo, pelo carinho e consolo sempre que precisei.

Ao meu pai (*in memoriam*) por sempre me ensinar a persistir e nunca desistir.

Ao meu marido Léo, querido você é valioso! Somos um em Deus, mas você com certeza é a melhor parte de mim, obrigada por todo seu carinho, paciência e apoio!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Sila Mary Rodrigues Ferreira, pela oportunidade e pelo crescimento. A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Mônica de Caldas Rosa dos Anjos, pelo apoio, pelas contribuições e pelo equilíbrio e sabedoria.

Aos parceiros em minha pesquisa Prof^a. Dr^a. Deise Montrucchio, no meu sonho realizado devo a você a parte mais difícil: a tarefa árdua de me ajudar a construí-lo! Prof^a. Dr^a. Elizabeth do Nascimento sem você teria sido impossível concluir, sua simplicidade e disposição contrastam com a sua experiência, com seus conhecimentos e com sua titulação. Muito obrigada pela acolhida!

Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho pela disposição, pelas contribuições, pelo trabalho árduo. Prof. Dr. Railson Henneber obrigada por seu trabalho, pelo suporte com os materiais e por me acolher em seu laboratório. Prof^a. Dr^a Aline Borsato Hauser também agradeço a acolhida no laboratório.

Aos técnicos da nutrição Jair Lima, Adriana, Jaqueline, Lindamir e Aline, da farmácia, e a Pós doutoranda Cristiane pelo apoio técnico, pelos almoços, pelas conversas, pelos sorrisos, pela amizade.

Às alunas voluntárias na pesquisa, Raquel M. dos Santos, Lessandra Souza, Vanessa Eggea, Priscila Zink, Marianna Marques e Amanda Celli por toda dedicação, pelo cuidado com os animais e pela descontração nos momentos oportunos. Vocês fizeram meus dias mais felizes!

À Gabriela Fortuna, uma riqueza em pessoa, aluna de IC que me ajudou muito e juntamente com Ana Peters e Josiane Tiborski foram excelentes companhias em Recife. Obrigada queridas!

Às colegas e amigas do programa Andréia, Andrieli, Bruna, Emelie, Marília, Natália, Maria Fernanda, Agatha, Patrícia e Lígia cada uma do seu jeito, acrescentou um pouco de si nesse período, juntas superamos essa etapa e juntas comemoremos! Cada uma de vocês merece!

À minha irmã Kellen, meu cunhado Anderson e meus sobrinhos Yara e Isaac, por me receberem sempre, por me proporcionarem momentos alegres em meio à família, vocês tornaram meus dias mais leves.

À minha igreja Bola de Neve em especial, Jaraguá do Sul, pela compreensão e incentivo.

Ao senhor Daniel Steidle da Fazenda Bimini pelo fornecimento dos frutos e pela receptividade.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional (PPGSAN) pelos ensinamentos preciosos e pela dedicação. Em especial Prof^a. Dr^a Claudia Krueger pelas correções ao longo do processo. E ao Mauro secretário do programa pela disposição de sempre.

À CAPES pelo suporte financeiro. A todos que contribuíram para a execução deste trabalho, direta ou indiretamente, e que não foram citados nominalmente, meu MUITO OBRIGADA!

A Ele (Cristo) toda honra e toda glória, porque d'Ele, por Ele para Ele são todas as coisas! (Rm 11:36).

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a
ciência... e não tivesse amor, nada seria.
1 Coríntios 13:2

RESUMO

O fruto *Jaracatiá spinosa* é utilizado em algumas comunidades, principalmente na alimentação escolar. Ensaios prévios indicaram toxicidade positiva nos testes *in vitro* para hemólise em sangue de carneiro e *Artemia salina*, com extrato alcoólico e polpa de jaracatiá. Assim, ensaios *in vivo* tornam-se relevantes para comprovação da segurança ao consumo. A presente investigação foi realizada para avaliar a segurança dos extratos bruto de frutos de *Jaracatiá spinosa in natura* (EJIN) e em calda (EJC). Seguindo o protocolo da *Organisation of Economic Cooperation and Development* (OECD), foram conduzidos experimentos agudo (2000 e 5000 mg/kg) e subcrônico (1250, 2500 e 5000 mg/kg/dia e 5000 mg/kg/dia em grupo satélite) de 28 dias, em camundongos Swiss de machos (n=30) e fêmeas (n= 25). Os animais foram avaliados em parâmetros comportamentais, fisiológicos, ganho/perda de peso, parâmetros bioquímicos e hematológicos. E, após eutanásia, foi realizada a análise macroscópica e histológica dos órgãos, estômago, intestino, fígado, rins, baço e pulmão, e comparados os resultados com grupo controle. Em ensaio agudo obteve-se como resultado dose letal (DL50) de extrato de jaracatiá spinosa em camundongos Swiss superior a 5000 mg/ kg, sugerindo baixa toxicidade oral do fruto. Em ensaio subcrônico foram observados efeitos dose-resposta no aumento do número de bolos fecais, piloereção, aumento no peso relativo do estômago e elevação da contagem do número de plaquetas em ambos os gêneros, dentre outros. Alterações bioquímicas e histológicas também foram observadas, principalmente em estômago, fígado e baço, inclusive em grupo satélite. Modificações que em conjunto com demais achados representam alterações relevantes em animais que consumiram tanto o extrato do fruto *in natura* quanto em calda.

Palavras-chave: *Jaracatiá spinosa*, toxicológicos, agudo, subcrônico.

ABSTRACT

Considering the use of Jaracatiá fruit by some communities, especially in school meals, and positive toxicity in the in vitro tests for hemolysis on sheep blood and brine shrimp lethality bioassay using alcoholic extract and Jaracatiá pulp. In vitro essays become relevant to prove the safety for consumption. This research was conducted to evaluate the safety of gross extract of Jaracatiá spinosa fruit in natura (EJIN) and syrup fruit (EJS). Following the protocol of the Organization of Economy Cooperation and Development (OECD) were conducted acute experiments (2000 and 5000mg/kg) and subchronic (1250, 2500 and 5000 mg/kg/day to 5000 mg/kg/day satellite group) 28 days in Swiss mice. The animals were evaluated in behavioral and physiological parameters, as the consumption of food and water, weight gain/loss, biochemical and hematological parameters. After the euthanasia, were held macroscopic and histological analysis of organs, stomach, intestine, liver, kidney, spleen and lung, and compared with the control group. In the acute test it was achieved as a result lethal dose (LD50) of Jaracatiá Spinosa extract in Swiss mice is higher than 5000 mg/kg, suggesting low oral toxicity of the fruit. In subchronic toxicity test were noticed dose – response effect of increasing the number of fecal boli, piloerection, increase in the relative weight of the stomach and increase the number of platelets count in both gender, among others. Biochemical and histological changes were also observed, especially in the stomach, liver and spleen, including satellite group. Changes that concurrently with other findings represent relevant changes in animals that consumed EJIN and EJC.

Keywords: *Jaracatiá spinosa*, toxicology, acute, subchronic.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	HIPÓTESE	12
3	OBJETIVOS	12
3.1	OBJETIVO GERAL	12
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4	REVISÃO DE LITERATURA	13
4.1	JARACATIÁ SPINOSA E A BIODIVERSIDADE	13
5.1	LÁTEX	17
4.3	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	18
5	MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1	AMOSTRA E DELINEAMENTO DO ESTUDO	22
5.2	PROCESSAMENTO DOS FRUTOS	23
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA	25
5.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA POLPA DO FRUTO	26
5.5	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	29
5.5.1	Animais e delineamento dos grupos de estudo	30
5.5.2	Elaboração do extrato bruto	30
5.5.3	Metodologia dos ensaios toxicológicos	31
6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	36
7	REFERÊNCIAS	38
8	ARTIGO 1 : Avaliação da toxicidade aguda e sub-crônica do extrato de fruto selvagem brasileiro, Jaracatiá spinosa, em camundongos	48
8.1	Introdução	49
8.2	Material e métodos	50
8.2.1	Frutos	50
8.2.2	Análises e preparação dos extratos	50
8.2.3	Ensaio biológicos	51
8.2.4	Estatística	53
8.3	Resultados e discussão	54
8.3.1	Caracterização dos frutos	54
8.3.2	Ensaio toxicológico agudo	54
8.3.3	Ensaio toxicológico subcrônico	55
8.4	Referências	65
9	ARTIGO 2 : Avaliação da toxicidade do extrato de Jaracatiá spinosa, em frutos <i>in natura</i> e em calda, em camundongos.	71
9.1	Introdução	72
9.2	Material e métodos	72
9.2.1	Frutos	72
9.2.2	Preparação dos extratos	73
9.2.3	Ensaio biológicos	73
9.3	Estatística	75
9.4	Resultados e discussão	76
9.4.1	Caracterização dos frutos	76
9.4.2	Ensaio Biológico	76
9.5	Referências	87
10	CONCLUSÃO GERAL	90

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, detentor de uma flora rica em espécies frutíferas comestíveis, que o torna o terceiro maior produtor de frutas do mundo, entretanto, a maior parte dessa riqueza permanece subutilizada e seu potencial desconhecido (MITTERMEIER, GIL e MITTERMEIER, 1997; LEWINSOHN e PRADO, 2005; IBGE, 2010).

Embora com tanta variedade, a última pesquisa de orçamento familiar no Brasil, realizada entre 2008-2009 constatou insuficiência no consumo de frutas, legumes e verduras na dieta da maioria dos brasileiros. E ainda demonstrou que dentre as vinte frutas mais consumidas no país somente três são nativas do bioma brasileiro (abacaxi, goiaba e maracujá) indicando o baixo consumo das espécies nativas (IBRAF, 2009; IBGE, 2010).

O atual modo de produção e consumo de alimentos hegemônico, não proporciona um incentivo adequado para a promoção da segurança alimentar e nutricional, pois está associado a importantes riscos na qualidade dos alimentos, com sistema de produção baseado em *commodities* e monoculturas reduzindo o consumo de alimentos locais e regionais. (MALUF, 2007; MORAIS; BORGES, 2010). As espécies vegetais pouco conhecidas e consumidas são desprezadas, e as matas onde se encontram essas culturas nativas são substituídas por lavouras e avanço das cidades, descaracterizando o consumo típico de um povo (CARNEIRO e DANTON, 2012; BEZERRA e SCHNEIDER, 2013). Mesmo no meio rural o vegetal nativo acaba sendo desprezado e esquecido pela cultura local, dando atenção aos industrializados e frutas mais populares oriundas de outras nacionalidades. Assim é importante buscar conhecimento sobre a dinâmica das relações econômicas, industriais, extrativistas e o potencial gerado por essa diversidade, entretanto esta prática requer precauções e medidas que visem o desenvolvimento sustentável, conciliando desenvolvimento sem esgotamento dos recursos naturais (CAZELLA, BONNAL e MALUF, 2009; PEREIRA e PASQUALETO, 2011).

Atualmente, o Brasil, por meio de programas governamentais e agências de fomento, têm incentivado ações e pesquisas visando o estímulo à promoção da biodiversidade com a finalidade de conservação, uso sustentável e reflorestamento das espécies nativas, inclusive como alternativas de geração de renda para as comunidades rurais (BRASIL, 2009, 2014).

Neste contexto, o jaracatiá proveniente principalmente da Mata Atlântica é um exemplo de fruto nativo acessível e consumido em algumas comunidades, o qual tem sido incentivado o resgate, por estar na lista de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná há quase duas décadas (BRASIL, 1995).

O jaracatiá é referenciado como uma espécie alimentícia não convencional, que pode ser utilizada para preparo de doces, a partir do fruto ou do caule ou para extração de papaína (PROSPERO, 2010; KINUPP e LORENZI, 2014). Contudo, apesar de haver referencial teórico do uso popular do jaracatiá, estas informações não são suficientes para validar eticamente a planta como segura. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda investigar toxicologicamente espécies não convencionais ou exóticas, para que haja comprovação da segurança no uso como fonte alimentar e/ou como subproduto (CASTRO, 1993; BRASIL, 2013; SIMÕES *et al*, 2007).

Considerando-se a utilização do fruto jaracatiá por algumas comunidades, descrições encontradas na literatura sobre seu uso popular, tendo em vista que o doce de jaracatiá é considerado patrimônio cultural do estado de São Paulo. Ainda, a realização de testes *in vitro* com extrato e polpa de jaracatiá, pela equipe deste projeto no Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, obteve hemólise positiva para sangue de carneiro e toxicidade no teste *Artemia salina*, havendo necessidade de realizar ensaios toxicológicos *in vivo* para comprovação da segurança ao consumo (WHO, 2000; FDA, 2007; LEWAN *et al.*, 1992; MANETTI *et al.*, 2010; PROSPERO, 2010).

2 HIPÓTESE

O extrato bruto de *Jacaratia spinosa* poderá provocar em alguma dosagem efeitos tóxicos em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a segurança alimentar de extratos de frutos de *Jaracatiá spinosa* em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar nutricionalmente o fruto do jaracatiá no estágio maduro.
- Avaliar a presença de efeitos tóxicos em camundongos após consumo agudo e subcrônico de extratos brutos da polpa *in natura* de *Jaracatiá spinosa* e do fruto em calda.
- Avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue dos animais após ingestão subcrônica dos extratos e frutos *in natura* e em calda.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 JARACATIÁ SPINOSA E A BIODIVERSIDADE

A promoção da diversidade de espécies vegetais alimentícias é fundamental para o abastecimento de alimentos, para o equilíbrio ambiental e para a valorização de frutos nativos. Ainda contribui com o reflorestamento e a produção local de alimentos, fortalece a agricultura familiar, culminando para a sustentabilidade: ambiental, social, econômica e cultural (PRESCOTT-ALLEN, 1999; LEFF, 2002; BRASIL, 2006; SANTOS, COSTA e ANJOS, 2011).

O incentivo à promoção dos frutos da sociobiodiversidade e ao desenvolvimento territorial sustentável, a promoção da agricultura familiar, e a criação de novos mercados, têm se tornado alvo de políticas públicas nos últimos anos. O cultivo ou manejo adequado como incentivo à promoção de produtos obtidos por produção agroecológica, processamento artesanal ou em pequena escala, são algumas estratégias eficazes para conservação da diversidade vegetal, como proposta à revalorização das espécies e promoção da segurança alimentar e nutricional (LEWINSOHN; PRADO, 2002, CONSEA, 2004, IPEA, 2007; MORGAN e SONNINO, 2010; CEPLAC, 2013).

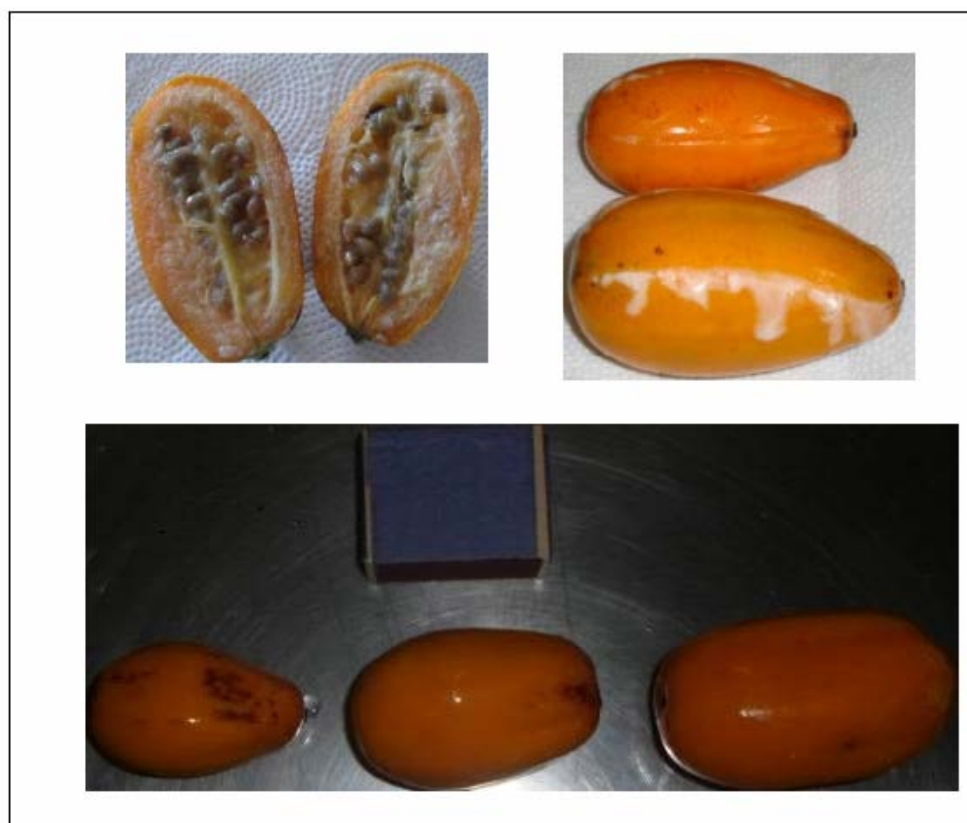
Dentro deste contexto destaca-se a espécie nativa *Jacaratia spinosa*, pertencente à família *Caricaceae*. Esta espécie foi referenciada no tratado descritivo do Brasil em 1587, possuindo distribuição ampla e predominando no bioma Mata Atlântica, apesar de ser encontrada também na Amazônia e Cerrado (SOUZA, 1938; IBGE, 2004; LLERAS, 2014).

É uma árvore de caule mole que floresce e frutifica de outubro a março, podendo atingir 30 metros de altura na floresta, mas quando cultivada geralmente não ultrapassa os 5 metros. Na região Sul, uma árvore produz 70 quilos de frutos por safra e sua propagação é possível tanto por meio do enraizamento de estacas dos ramos como por meio de sementes que frutificam após 2 a 5 anos do plantio (CARVALHO, 2006; TRÓPICOS, 2013);

O jaracatiazeiro possui folhas compostas palmadas de 8 a 12 folíolos de 15 centímetros, lisos; as flores são bem pequenas e unissexuadas com flor masculina e

feminina que diferem em características físicas. Produz frutos carnosos indeiscentes, ovalados ou piriformes, em forma de bagas. O aspecto físico (FIGURA 1) desses frutos e sementes é muito similar ao mamão *papaya*, porém menores com 10 a 15 cm e contendo sementes de 0,5 cm. Mesmo com a similaridade física com o mamão ele difere em sabor, sendo mais semelhante à combinação de maracujá e a manga (LORENZI, 2002; DONADIO; 2004; AGUIAR, ALMEIDA, e CAMARGOS, 2012; TROPICOS, 2013).

FIGURA1 - FRUTOS DE Jaracatiá spinosa



FONTE: A autora (2016)

Conhecido popularmente como mamão-bravo, mamãozinho do mato, chumburu e jaracatiá, é botanicamente colocado em sinonímia ainda como *Jaracatiá dodecaphylla*, por coincidir com a maioria dos registros cromossômicos para o gênero. No entanto, alguns botânicos sugerem uma melhor classificação e separação da espécie, uma vez que o *dodecaphylla* é comido por animais como veado e o cateto e o *spinosa* por possuir látex cáustico não é apreciado pelos referidos animais (FEDOROV, 1969; LIMA, 1984; TRÓPICOS 2013). De acordo com

Badillo (1971), *J. spinosa*, entre 1775 e 1889 era denominada *J. actinophylla*, *Papaya spinosa* e *Carica spinosa*, em 1902 *J. dodecaphyllae* e já foi denominada também *J. costarricensis* em 1924 (BADILLO, 1971).

O quadro 1 apresenta a organização taxonômica deste exemplar:

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO JARACATIÁ *SPINOSA*

REINO	PLANTAE
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht.
Ordem	Rosanae Takht.
Subordem	Brassicales Bromhead
Família	Caricaceae Dumort.
Gênero	Jacaratia A. DC.
Espécie	<i>J. spinosa</i>

FONTE: Carvalho (2006); Trópicos (2013); Lleras, (2014)

O *Jacaratiá spinosa* está na categoria dos denominados Produtos Alimentícios Não Convencionais (PANC's) e mesmo não sendo conhecida do público em geral é considerada uma espécie vegetal de grande importância, pois além do consumo do fruto *in natura* ou em compota, frutos verdes e a medula de seu tronco ralada são utilizados no preparo de doces similar à cocada, e a papaína utilizada para o amolecimento de carnes, o que pode representar um potencial econômico da planta às populações rurais (OLIVEIRA, 2009; KINUPP e LORENZI, 2014). A prática de extração total do tronco pode ter contribuído para o desaparecimento dessa espécie no interior do Brasil levando ao desconhecimento da população a respeito da árvore e seus frutos (KINUPP, 2007; TROPICOS, 2013.).

Atualmente algumas comunidades estão resgatando a utilização e plantio de mudas do jaracatiá, procurando fortalecer a tradição regional, a exemplo da cidade de São Pedro em São Paulo, onde o fruto tem sido inserido na alimentação escolar e na comunidade por meio de um festival organizado pela escola Iracy Bertochi onde são preparados bolos, amanteigados, sorvetes, trufas, compotas, bombons e *cupcakes* a partir dos frutos (FOLHA DE SÃO PEDRO, 2014).

Apesar da variedade de possibilidades de consumo, alguns autores sugerem que para utilização *in natura*, os frutos precisam ser estriados (feridos) para eliminar previamente o excesso de látex e que o consumo excessivo pode ocasionar febre e

desarranjo gástrico, ainda afirmam que os guaranis consomem os frutos apenas cozidos e que desta forma seriam inofensivos (HOEHNE, 1946; MARTÍNEZ-CROVETTO, 1968; KINUPP e LORENZI, 2014).

Ainda que, haja indícios do uso popular, não foi encontrado na literatura nenhum dado referencial sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo fruto em ensaios experimentais. No entanto, evidências toxicológicas apontam que toda substância é potencialmente tóxica, dependendo da dose administrada ou absorvida e do tempo de exposição (KHOO, 2010). Desta forma, uma planta ou fruto não convencional deve ter sua ação e nível tóxico avaliado previamente, a fim de comprovar cientificamente a segurança, pois o uso popular e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas como seguras (AGRA et al., 2007; SIMÕES et al., 2007).

Apesar de não haver dados de toxicidade da espécie um relato interessante pode ser encontrado no livro “Memórias” de Visconde de Taunay. Nele, Taunay narra seu encontro com o senhor Manuel Coelho o qual refere ter recebido um conselho de um curandeiro sobre “um remédio certo, mas violento” para o seu “mal de empalamado¹”, “leite de jaracatiá tirado pela manhã e bebido perto da árvore”. Porém Taunay sugere ao amigo que não faça uso, pois “poderia ficar todo queimado por dentro”. Taunay refere que ao conversar com Dr. Teixeira da Rocha no Rio de Janeiro “verificou que havia dado um péssimo conselho ao amigo”, “porquanto o leite de jaracatiá, terapêutico usado no sertão, constituía-se aceito pela ciência”, pois “extermina os *ancilóstomos duodenais*” que caracterizam esta enfermidade (TAUNAY, 2004).

De fato, na literatura um ensaio realizado com o látex (leite) de jaracatiá em helmintos impediu em 80% a evolução larval do ovo em 48 horas, mas observou-se após as 24 horas seguintes que perdeu a eficiência o que permitiu a eclosão dos ovos (FURTADO, 2006).

Em outro ensaio de toxicidade subaguda realizado com o látex, porém proveniente da banana verde, foi demonstrado a congestão e infiltração leucocitária nos rins, fígado e pulmões de ratos *Wistar*, apontando para a possibilidade de toxicidade do látex de frutos (CUNHA et al., 2009).

¹ Termo médico derivado de Opilação - Infecção causada por vermes, que atinge o homem e vários mamíferos e se caracteriza por anemia grave.

Tendo em vista o crescimento da utilização de plantas medicinais pela população brasileira e o incentivo para pesquisas de frutos da biodiversidade, se faz necessário investigar toxicologicamente as espécies estudadas. Neste sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) prevê que a utilização de espécies vegetais não convencionais ou exóticas, ou que não são usadas tradicionalmente como alimento, nativas ou proveniente de outros países, tenha comprovação da segurança de uso pré-mercado, com objetivo de proteger a saúde da população e reduzir os riscos associados ao consumo desses produtos, em resposta às constantes inovações tecnológicas e ao aumento do comércio internacional (BRASIL, 2013)

5.1 LÁTEX

O látex é encontrado na natureza como uma secreção esbranquiçada, ou raramente amarelada, produzida por algumas plantas como a seringueira (*Hevea brasiliensis*), mamoeiro (*Carica papaya*), papoula (*Papaver rhoeas*), babosa (*Aloe barbadensis*). As famílias mais comuns de plantas lactíferas são: Euphorbiaceae, Apocynaceae, Moraceae, Clusiaceae, Sapotaceae, Solanaceae, Asclepiadaceae, Cichorieae (Asteraceae) e Guttiferae (AGUIAR, 2006).

Plantas estas que quando feridas secretam o látex, uma secreção de fluido pegajoso, geralmente esbranquiçado ou raramente amarelado, contido internamente em quase todos os tecidos da planta. Quando a planta sofre lesão, esses canais se rompem e o látex é secretado externamente, após exposição ao oxigênio, ocorre um fenômeno de coagulação resultante de reação de oxidação. O processo envolve a formação de uma rede de polímeros de isopreno que formam uma estrutura denominada de borracha (AGUIAR, 2006; RAJESHA et al., 2006)

Existem 35 mil espécies de plantas lactescentes, as quais frequentemente apresentam compostos tóxicos. Um grupo importante de proteínas presentes no látex são responsáveis pela proteção contra várias agressões, ambientais, de fungos ou insetos. São mediadores alérgicos de origem vegetal, que se encontram presentes em várias plantas (KONNO et al., 2004).

Estudos químicos evidenciam no látex a presença de antraquinonas, compostos orgânicos derivados do antraceno, formados a partir da oxidação de

fenóis. E, remetem às antraquinonas os efeitos tóxicos e repelentes observados nas plantas (RAJESHA et al., 2006)

4.3 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A toxicologia é a ciência que objetiva o estudo do efeito adverso de alguma substância química ou física sobre organismos vivos. Também é referenciada como a ciência dos venenos. Tem como principal finalidade estabelecer a segurança da dose da substância estudada que pode interagir com o organismo vivo, de modo a prevenir o aparecimento de efeitos colaterais (LEITE; AMORIM, 2003; MOURA *et al.*, 2012). A história dos estudos de toxicidade começa com Paracelso (1493-1541), que determinou substâncias químicas específicas responsáveis pela toxicidade de plantas e animais. Ainda demonstrou os efeitos inofensivos e benéficos de toxinas e as relações dose-resposta para os efeitos das drogas. Paracelso afirmou que “todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja. A dose certa é que diferencia um veneno de um remédio” (PARASURAMAN, 2011, p. 74).

As legislações brasileira e internacional no processo de comprovação da segurança de uso de alimentos e ingredientes prevêm a avaliação da finalidade de uso e de seu risco à saúde conforme critérios científicos (FAO 2011, Brasil 2013). O *Codex Alimentarius* prevê que a primeira etapa da avaliação do risco de um produto deve consistir na identificação dos perigos presentes. Estes perigos podem ser devido a agentes biológicos, químicos ou físicos, ou ainda a composição de um alimento, capaz de provocar um efeito nocivo à saúde (FDA, 2007; FAO, 2011).

A avaliação do risco constitui um processo estruturado e sistemático, composto pelas fases de identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. A identificação e caracterização do perigo determinam o perfil, a natureza e a extensão dos efeitos adversos à saúde associados ao produto ou alimento em questão. Essa caracterização permite o estabelecimento de uma relação dose-resposta, que é utilizada para a definição de um valor de segurança para a ingestão do produto (FDA, 2007; FAO, 2011; BRASIL, 2013).

Recomenda-se que esses estudos sejam realizados de acordo com diretrizes internacionais, como as da *Organisation of Economic Cooperation and Development*

(OECD) (BRASIL, 2013). A OECD é uma organização que estabelece padrões internacionais para a segurança de alimentos e ingredientes. As diretrizes da OECD para os ensaios de produtos químicos de números 423 (toxicidade oral aguda) e 407 (toxicidade oral de doses repetidas de 28 dias) são métodos reconhecidos internacionalmente, eficazes e que visam a diminuição do sofrimento e número de animais experimentais. Protocolos da OECD foram utilizados em estudos anteriores para avaliação toxicológica de frutos e produtos naturais (ALMANÇA, 2011; LAGARTO *et al.*, 2011; BETTI *et al.*, 2012; PORTO *et al.*, 2013; CHIRANTHANUT *et al.*, 2013; BAKOMA *et al.*, 2013).

A utilização de animais em pesquisas deve ser realizada com cautela e ética, considerando todos os cuidados com animais (BRASIL, 2009). A ANVISA prevê ensaios de toxicidade *in vitro* e quando negativos são considerados suficientes para concluir que uma substância não possui potencial tóxico. Determina que um ou mais resultados positivos de toxicidade *in vitro* requerem ensaios para observação *in vivo*. A seleção desses ensaios é feita, caso a caso, tendo em conta os resultados dos ensaios *in vitro* da substância (BRASIL, 2013).

O uso de animais em pesquisas é importante para gerar conhecimento para organismos vertebrados, questões éticas impossibilitam o uso de seres humanos em investigações e desenvolvimento de novos tratamentos fundamentais para o entendimento da fisiologia do organismo. A ANVISA e o Código de Nuremberg determinam que qualquer experimentação em humanos deva ser precedida pela experimentação animal (SANTOS, 2002; SILVA *et al.*, 2015).

O camundongo é mundialmente o mamífero mais utilizado em experimentos, isso se deve ao fato de ser pequeno, bastante prolífero, de fácil manutenção e por possuir semelhanças fisiológicas, celulares e moleculares aos humanos (WOLFENHSON & LLOYD, 1994; HUNTER & ISAZA, 2008; RDSCMP, 2010).

As diretrizes para testes toxicológicos da *Organisation of Economic Co-operation and Development* (OECD) surgem no final da década de 80 e são indicados atualmente pela ANVISA. A OECD é uma organização que estabelece padrões internacionais para a segurança de uso de produtos químicos e substâncias farmacêuticas (FOWLER; RUTTY, 2009; PARASURAMAN, 2011).

O *Internacional Life Sciences Institute* demonstrou em seus levantamentos, alto índice de concordância da toxicidade dos fármacos em animais e seres humanos. A maior incidência de concordância geral foi observada em alterações

hematológicas, gastrointestinais e cardiovasculares (OLSON, 2000). Estudos ainda demonstram que efeitos tóxicos observados em humanos encontram-se geralmente, na mesma faixa de concentração daqueles dos animais de laboratório. A exposição de animais a testes de toxicidade com doses mais elevadas é um método necessário e válido para a descoberta de possíveis efeitos nocivos à espécie humana que é exposta a doses muito menores (KLAASSEN, 2006; AESAN, 2007). A extrapolação das doses utilizadas em animais para humanos baseia-se em múltiplas suposições sobre os efeitos do composto entre as espécies. Uma aproximação comumente utilizada é baseada na dose do composto que possui ausência de efeitos tóxicos na mais sensível das espécies testadas em ensaios toxicológicos de quatro semanas, usando a NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) (REIGNER & BLESCH, 2002; BECK et. al., 2008).

A avaliação da toxicidade dos frutos da biodiversidade e plantas por meio de ensaios toxicológicos agudo e subcrônico em camundongos é bastante utilizada e prevista pela ANVISA e órgãos internacionais (OECD, 1995, 1998, 2008; BRASIL, 2013; FDA, 2007; PATEL et al., 2008; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010; SILVA et al., 2015). Os testes são empregados para avaliar e verificar a capacidade que uma substância possui em causar algum prejuízo à saúde humana (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010; SILVA et al., 2015).

A toxicidade aguda consiste em avaliar os efeitos adversos observados ou produzidos dentro de um período curto. Compreende a utilização da dose ou de múltiplas doses dentro de 24 horas e a verificação da ocorrência ou não da letalidade de 50% dos animais nos próximos 14 dias. A via oral é a mais indicada, podendo ser utilizadas outras vias de administração, considerando a exposição humana (BRASIL, 2013; PATEL et al., 2008; FOWLER; RUTTY, 2009; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010).

Já os testes de toxicidade subcrônica propiciam informações sobre a toxicidade das substâncias químicas depois de repetidas exposições. Também possibilitam estabelecer doses nas quais não se observam efeitos tóxicos, bem como permitem caracterizar e identificar os órgãos-alvo e o modo como são afetados após repetidas exposições. Ainda assim, após o período de utilização é possível determinar se o efeito é devido ao acúmulo ou não da substância utilizada (FAUSTMAN et al. 1994, OECD 1995, 1998; WHO, 2009).

As dosagens estabelecidas para o ensaio de toxicidade subcrônica são determinadas de acordo com os testes de atividade geral (*screening* hipocrático) que consiste na observação de parâmetros comportamentais e fisiológicos de animais de experimentação durante a determinação da Dose Letal Aproximada (DLA) e com a estimativa da DL50 ou, ainda, quando existem informações sobre doses necessárias para exercer o efeito farmacológico nos animais de experimentação ou em humanos. Recomenda-se a utilização de pelo menos uma dose (a maior) ou até três doses, suficientemente espaçadas para mostrar diferenças na gradação dos efeitos tóxicos. A Diretriz 407 da OECD descreve todos os cuidados para realização deste teste, como temperatura do local, umidade e ambientação de animais (FAUSTMAN et. al. 1994, OECD 1995,1998; WHO, 2009).

Os ensaios toxicológicos permitem avaliar efeitos adversos provocados por exposição em curto e longo prazo, a identificação dos órgãos–alvo de toxicidade e o modo como são afetados e ainda, a avaliação da maior concentração da substância que não causa uma alteração considerada adversa ou ainda a dose responsável pela morte de 50% dos animais (OECD 1995,1998; PATEL et al. 2008; ANTONELLI-USHIROBIRA et al, 2010; BRASIL, 2013).

Compõe a metodologia dos ensaios toxicológicos, a avaliação de parâmetros mais comuns de toxicidade, como: modificação no consumo de ração, peso, cor, textura ou ereção de pêlos, alterações respiratórias e circulatórias; anormalidades motoras ou de comportamento; avaliação bioquímica sérica e hematológica; bem como, a pesagem dos órgãos e avaliações histológicas (BARNES e DOURSON,1988; OECD 1995,1998; BALIGA et al., 2004; PAGÁN e ROWL e URBAN , 2006; MUKINDA e SYCE, 2007; LAHLOU; ISRAILI; LYOUSSI, 2008). Sinais de toxicidade sistêmica podem ser definidos pela diminuição considerável no consumo de água e ração, associado às alterações comportamentais, apatia, além da redução da massa corpórea e da evolução ponderal, quando comparados com o grupo controle (CUNHA, 2009).

O “*Screening* hipocrático” consiste em observação de parâmetros comportamentais e fisiológicos de animais de experimentação, ante a administração de preparações à base de plantas, fornecendo uma estimativa geral dos sinais de toxicidade da substância sobre o estado de consciência e disposição geral, atividade, reflexos e coordenação dos sistemas nervoso central, autônomo e motor (MALONE & ROBICHAUD, 1983). É um ensaio bastante útil que permite a seleção

de espécies que apresentam resultados mais significativos fornecendo uma estimativa geral da toxicidade da substância (CALIXTO, 2000; WHO, 2009). De acordo com protocolo padrão para observação dos parâmetros de comportamento, é possível definir dosagens intermediárias às usadas no teste de atividade farmacológica para avaliação de toxicidade subcrônica (MALONE & ROBICHAUD, 1983; REIGNER & BLESCH, 2002).

Estudos prévios com o *Jaracatiá spinosa* demonstram potencial tóxico nos testes *in vitro* de hemólise em sangue de carneiro e toxicidade frente a *Artemia salina*. O estudo toxicológico preliminar realizado com *Artemia salina* revelou toxicidade para as amostras de polpa madura de jaracatiá *in natura* desidratada e esterilizada, com uma CL50 777,82 µg/mL e 393,40 µg/mL, respectivamente (ABREU, 2015).

A análise de hemólise em sangue de carneiro nas dosagens 100, 200, 500, 1000 µg/mL indicou a possível presença de compostos tóxicos no fruto *in natura* seco, esterilizado e em seus extratos e frações, sendo que a fração hexano do extrato alcoólico, o extrato cetônico e sua fração hexano, bem como clorofórmio, apresentaram maior atividade hemolítica sobre os eritrócitos (ABREU et. al, 2015). A atividade hemolítica quando detectada indica possível toxicidade devido à forma de atuação do composto em estudo no organismo vivo, pois com a liberação de hemoglobina livre no plasma, órgãos como fígado, rins e coração podem ser prejudicados (CARVALHO et al., 2007).

Estes dados aliados aos relatos de consumo deste fruto, demonstram a necessidade de estudos toxicológicos *in vivo*, relevantes para a comprovação da segurança ao consumo do *Jaracatiá spinosa*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA E DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental no qual o fruto do jaracatiá foi submetido à caracterização física, química e avaliação toxicológica.

O subprojeto faz parte do projeto de pesquisa “Qualidade nutricional e fitoquímica de frutos da sociobiodiversidade” que foi registrado no Cnpq/Acesso de remessa da amostra de componente do patrimônio genético sob a autorização de nº.

010004/2015-7, como também de uma meta do Projeto Casadinho/PROCAD, O Desafio da Segurança Alimentar e Nutricional na Comunidade Escolar, sob o processo No. 552448/2011-7, ambos coordenados pela Profa. Dra. Sila Mary Rodrigues Ferreira.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA, da UFPR sob nº. 869 e prevê o tratamento dos animais em conformidade com os princípios definidos pelas Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, obedecendo também, aos preceitos da legislação brasileira (Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008), proporcionando condições de vida adequadas às espécies, contribuindo para sua saúde, conforto e bem-estar animal (BRASIL, 2008).

A coleta de 35 quilogramas de frutos ocorreu em 10 de Fevereiro de 2015, na Fazenda Bimini, Rolândia - PR (Coordenadas: 23°14'48"S 51°24'43"W) que cedeu autorização para coleta de frutos com destino à pesquisa. O arboreto onde estão os jaracatiás é uma parceria com a Embrapa-Floresta e tem finalidade educativa. Desta forma as amostras foram adquiridas por meio de doação.

O arboreto da fazenda Bimini possui duas árvores de jaracatiá, sendo coletados frutos de diversos pontos a fim de homogeneizar a amostra.

Após a coleta os frutos foram acondicionados em caixas de poliestireno com gelo a uma temperatura aproximada de 12°C e transportados ao laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Jardim Botânico, Curitiba-PR. A determinação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná por meio da exsicata de nº. 379131.

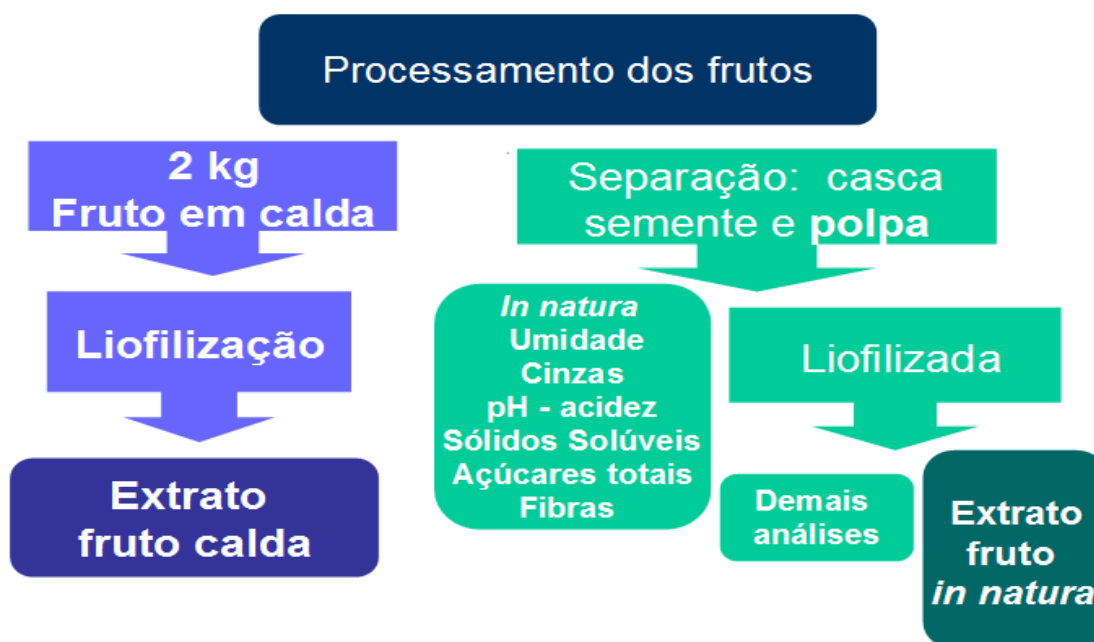
5.2 PROCESSAMENTO DOS FRUTOS

Os frutos foram dispostos em uma cuba de aço inoxidável, lavados em água corrente, imersos por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 250 *ppm*, enxaguados em água corrente e expostos para secagem em bancada à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas, sendo posteriormente retirado o excesso de umidade com papel toalha (SILVA JUNIOR, 2014).

Para as análises foram utilizados apenas frutos maduros, com pelo menos 75% da casca laranja (ABREU, 2015). Na sequência, os frutos foram submetidos ao processo de retirada do pedúnculo, separação da casca, da polpa e das sementes, metodologia adaptada de Schweiggert, et. al. (2011). A polpa foi processada em multiprocessador de alimentos marca Arno®, separados 100g para as análises do fruto fresco e o restante foi porcionado em 100 gramas de fruto aproximadamente, embalados, identificados e levados ao freezer para congelamento a aproximadamente -20°C.

Aproximadamente dois quilos de frutos foram destinados ao preparo do fruto em calda. A preparação seguiu metodologia referida popularmente. Primeiramente foram feitas pequenas incisões longitudinais no fruto *in natura* e deixando-o de molho por 24 horas em água, a fim de drenar parcialmente o látex. No dia seguinte acondicionou-se 450 gramas de frutos cortadas em cada vidro e procedeu-se a adição de 280 ml de calda quente a 90°C, preparada a base de xarope de açúcar refinado a 40° Brix (40% de açúcar). Os vidros foram levados ao banho-maria por 30 minutos a aproximadamente 98°C, em seguida foram resfriados com água corrente até temperatura aproximada e 37°C e refrigerados a 4°C (SILVA NETO, 2006). Posteriormente foram moídos em processador da marca Arno®, porcionados em embalagens de polietileno, levados ao congelamento -18°C e liofilizados.

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DE JARACATIÁ PÓS-COLHEITA



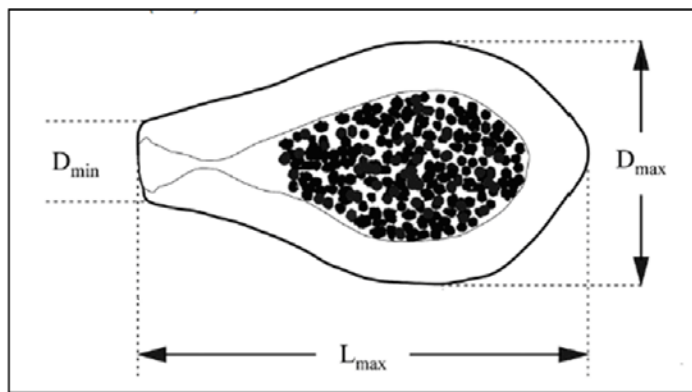
FONTE: A autora (2016)

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

Após a higienização, com frutos sadios em estágio maduro, coletados aleatoriamente em cinco pontos distintos da cuba, foram submetidos à análise física (ABREU, 2015).

A análise física de dimensionamento foi realizada em quintuplicata e os resultados das medições foram analisados em programa estatístico *SPSS*®. Os frutos foram pesados em balança analítica, com especificidade de pelo menos duas casas decimais, sendo medidos o comprimento máximo ($L_{\text{máx}}$), o diâmetro máximo ($D_{\text{máx}}$) e o diâmetro mínimo (D_{min}) em paquímetro da marca *VERNIER*®, conforme FIGURA 3 (SCHWEIGGERT et al. 2011).

FIGURA 3 - CARACTERÍSTICAS DAS DIMENSÕES MORFOLÓGICAS



FONTE: SCHWEIGGERT et. Al., 2011

Para a determinação dos sólidos totais da polpa foi empregado um refratômetro digital (RTD95 Instrutherm®), sendo os valores expressos em porcentagem (%).

5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA POLPA DO FRUTO

As análises físico-químicas, realizadas em triplicata, envolveram a determinação da umidade, cinzas, pH, acidez titulável total (ATT), sólidos solúveis totais (SST), lipídeos, proteínas e carboidratos por diferença.

A umidade foi determinada por secagem direta em estufa de acordo com a metodologia AOAC (2005).

A análise de cinzas foi realizada de acordo com método 940.26 AOAC (2005). Aproximadamente 5g da amostra foi pesada em cadinhos, previamente padronizado, e levados a secar e carbonização em chapa elétrica. Posteriormente, as amostras foram incineradas em mufla marca *Robertshaw®* modelo *Indic 50* a 550°C, até eliminação do carvão, e resfriada em dessecador até o momento da pesagem. O teor de cinzas foi calculado a partir da diferença existente entre a amostra após incineração e o peso do cadinho. Os resultados foram expressos em teor por 100g de fruto.

O pH dos frutos foi determinado por processo eletrométrico de acordo com a metodologia AOAC 942.15 (2005). A técnica consiste na utilização de 10g de amostra, os quais foram homogeneizados com 100mL de água destilada e aferidos

em pHmetro. Utilizou-se o pHmetro da marca *Analyser®*, modelo pH300 previamente calibrado.

A acidez titulável total (AAT) foi determinada de acordo com o método 942.15 AOAC (2005), o qual consiste em titular 10g da amostra triturada diluída em 100 mL de água destilada com solução de hidróxido de sódio 0,1M até atingir pH 8,0, aferido por pHmetro marca *Analyser®*, modelo pH300, previamente calibrado.

Os sólidos solúveis totais (°Brix) foram determinados no suco extraído da fruta na diluição de 2g em 10mL de água destilada, sendo utilizado refratômetro de bancada marca RTD 95 *Instruterm®*, corrigido para 20°C, calibrado previamente com água destilada a 20°C. Em seguida, foram adicionadas duas gotas de cada amostra no prisma do aparelho e realizada a leitura. No final de cada repetição, o prisma do refratômetro foi lavado com água destilada e seco com papel suave (AOAC,2005).

A determinação das fibras alimentares foi realizada pelo método enzimático-gravimétrico, 985.29 da AOAC, 2005. Foi preparada solução em triplicata com um grama da amostra *in natura* adicionada a 50 mL de tampão fosfato e 100µL de α amilase-termo-resistente, a qual foi coberta com papel alumínio, colocada em banho-maria com agitação a 95°C por 30 minutos. Quando a solução atingiu a temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 7,5 com solução hidróxido de sódio, foi adicionado 5mg de protease e novamente foi retornado ao banho-maria a 60°C por 30 minutos sob agitação constante. Após esfriamento à temperatura ambiente, o pH da amostra foi ajustado para 4,0 - 4,6 com solução de ácido clorídrico quando foram acrescentados 300µL de amiloglucosidase e novamente levados ao banho-maria a 60°C por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 280mL de etanol 95% pré-aquecido em cada solução, que repousou por 1 hora à temperatura ambiente. Após a pesagem de cadinhos, a solução etanólica foi filtrada sob vácuo, o resíduo foi transferido para o cadinho com pequena porção de etanol 78%, cada resíduo foi lavado três vezes com 20mL de etanol 78%, duas vezes com 10mL de etanol 95% e 2 vezes com 10mL de acetona. Os cadinhos foram secos com os resíduos em estufa a 100°C. Após esfriarem em dessecador, pesados e os resíduos calculados para obter o valor de fibras alimentares totais.

A determinação da proteína bruta foi realizada pelo método Kjeldahl de acordo com a metodologia 991.20 da AOAC (2005), onde é realizada a determinação do nitrogênio em três etapas: digestão, destilação e titulação. Na primeira etapa foi

pesada aproximadamente 0,5g da amostra homogeneizada que foi submetida à digestão com ácido sulfúrico e catalisador sulfato de cobre e sulfato de potássio, formando sulfato amoniacal. Na segunda etapa, realizou-se a destilação por arraste de vapor da amônia, a qual é recebida em Erlenmeyer contendo ácido bórico a 4% e gerando um complexo de coloração verde. Na terceira etapa, a amônia foi titulada com ácido sulfúrico 0,02M até formação de complexo cor-de-rosa. O cálculo para determinação de proteínas foi realizado pela fórmula descrita a seguir:

$$\% \text{ de proteínas} = V \times 0,14 \times f / P$$

Onde:

V: volume de ácido sulfúrico gasto na titulação

f: fator de conversão (6,25)

P: peso da amostra

O teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet 920.39C da AOAC (2005), que consistiu na extração a quente da amostra com éter de petróleo e posterior destilação. O teor de lipídeos foi calculado de acordo com a diferença de peso existente entre o balão pesado previamente e o balão com o extrato etéreo e expresso em 100g de fruto.

O teor de carboidrato foi calculado por diferença utilizando a fórmula:

Carboidratos (%) = 100 – (% umidade + %cinzas + % proteínas + % gorduras + % fibras).

Os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico de acordo com Dubois et al. (1956). Para determinação de açúcares totais foram pesados 100mg da amostra *in natura* para uma solução de 100mL de água, da qual se utilizou 100µL para a análise. Em uma série de tubos foram colocadas concentrações crescentes de glicose, variando entre 20 e 70µg. O volume foi completado para 1ml com água destilada e adicionado 1ml do reativo de fenol e 5ml de ácido sulfúrico concentrado. Após 20 minutos para resfriamento realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 490nm.

O valor energético (VET) foi estimado utilizando-se os fatores de conversão de 4 kcal g⁻¹ de proteína ou carboidrato e 9 kcal g⁻¹ de lipídios (OSBORNE e VOOGT, 1978).

$$VET = (Px4) + (Cx4) + (Lx9)$$

Onde:

P: Teor de proteína

C: Teor de carboidratos

L: Teor de lipídeos

O processo de extração dos carotenóides, realizado em triplicata, iniciou com a mistura de 2,5g do fruto liofilizado em 20mL de acetona. A extração foi realizada em agitador magnético por 2 horas à temperatura ambiente, mantendo-se as amostras protegidas da luz. Os extratos foram filtrados em membrana de celulose sob vácuo. Os extratos filtrados foram transferidos para tubos de centrifuga e adicionados de 20mL de éter de petróleo e 10mL de água destilada deionizada. A centrifugação ocorreu a 3000 rpm por 10 minutos. Posteriormente a solução dos pigmentos em éter de petróleo foi transferida para um balão volumétrico completando-se o volume para 50mL com éter de petróleo.

O teor de carotenóides totais foi determinado em espectrofotômetro (Glod S53 UV-Vis, Ningbo Biocotek) a 450nm em éter e petróleo e o resultado expresso em termos de β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Conforme a Equação:

$$T \text{ de } \beta \text{ caroteno } (\mu\text{g}) = \frac{A}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \times \frac{V}{c} \times \frac{10^6}{M_m} \times \frac{1}{10}$$

Onde:

A: absorbância da solução no comprimento de onda de 450nm;

V: volume final da solução;

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ coeficiente de extinção ou coeficiente de absortividade molar de um pigmento em um solvente específico- sendo em éter de petróleo utilizado o valor 2592 (BRITTON, 1995);

M: massa da amostra tomada para a análise.

5.5 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

5.5.1 Animais e delineamento dos grupos de estudo

Para o experimento foram utilizados camundongos heterogêneos, ou seja, com consanguinidade mínima, espécie *Mus musculus*, linhagem *swiss* com idade entre seis e sete semanas e peso entre 25 e 35 gramas (SANTOS, 2002; FRANCO, 2006, DAMY et. al., 2010). Os animais, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, foram aclimatados por um período de sete dias e mantidos durante todo o experimento no Laboratório Multiusuário de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição.

Para formar os grupos foi considerada a distribuição inicial das caixas do biotério central, a fim de evitar conflito entre os animais de diferentes grupos conforme orientação da bióloga chefe. O número de animais por grupo e o número de grupos dependeu do ensaio toxicológico que os animais foram submetidos, conforme pode ser visualizado no item referente ao ensaio toxicológico 5.5.3.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno opacas, forradas com maravalha de madeiras com tampa do tipo grade de arame, ocorrendo limpeza e troca de maravalha em dias alternados. Essa condição se manteve durante todo o experimento. Nas gaiolas os animais foram agrupados em três para o ensaio agudo e ou cinco animais para subcrônico. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura controlada a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram acesso à água potável e ração comercial padrão *ad libitum*. (DAMY et. al., 2010). A ração administrada aos animais tinha a seguinte composição centesimal: 22% de proteína, 4% de lipídeo, 7% de fibra e 12,5% de umidade.

5.5.2 Elaboração do extrato bruto

Os frutos em calda e polpa *in natura* após o processamento e etapa de congelamento (detalhamento item 5.2), foram liofilizados e diluídos em água destilada e emulsificante *tween 80* (5%).

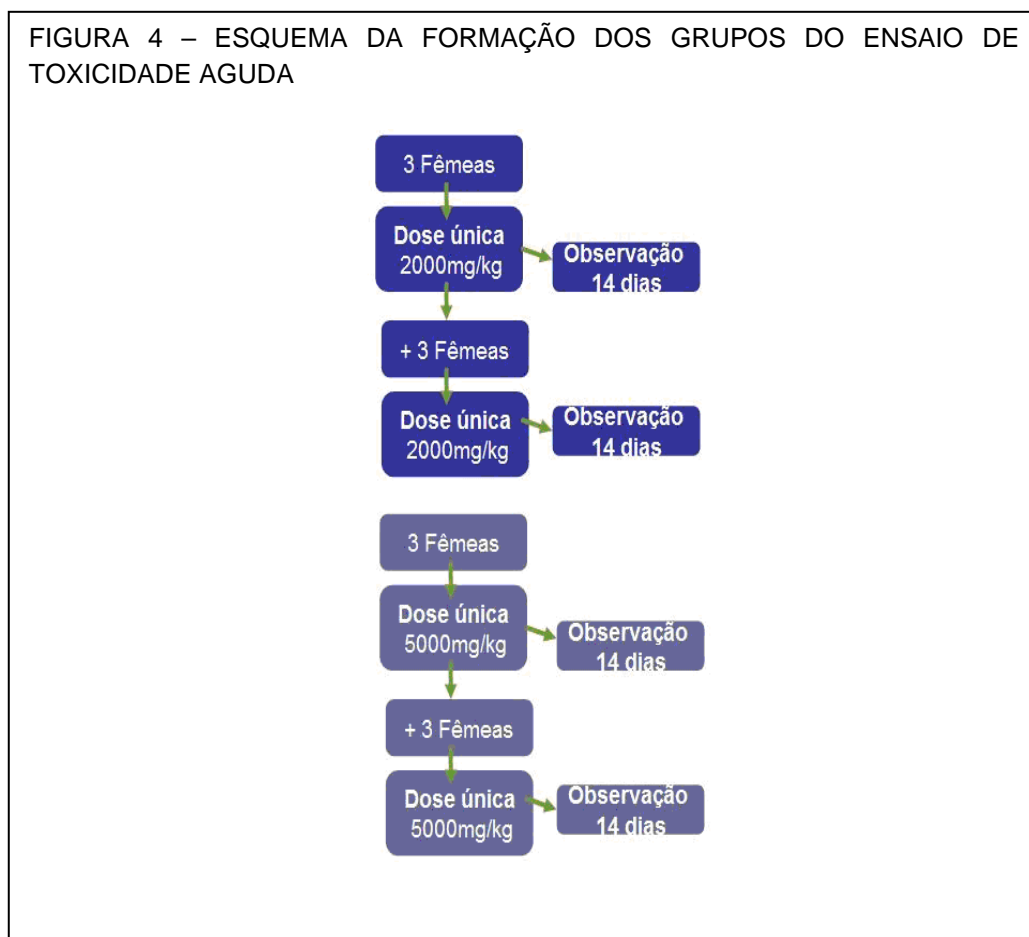
As soluções foram elaboradas na concentração de 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml, para frutos *in natura*, e 500 mg/ml frutos em calda. Considerando-se a perda da água do fruto, após a liofilização, utilizamos 21,5mg de fruto liofilizado por ml, 43mg/ml e 86 mg/ml respectivamente.

Estabelecendo-se como critério um adulto de 65 kg, foram administradas dosagens compatíveis ao consumo de três (1250 mg/kg), seis (2500 mg/kg) e doze (5000 mg/kg) unidades de frutos *in natura* por dia e de seis (5000 mg/kg) unidades de fruto em calda (MIGLIATO et al., 2007; AWODELE et al., 2013; PERK, et al., 2013).

5.5.3 Metodologia dos ensaios toxicológicos

a) Toxicidade aguda

A FIGURA 4 resume os grupos e dosagens utilizadas no experimento para avaliação da toxicidade aguda.



FONTE: a autora (2016)

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados conforme metodologia OECD 423 (2001) o qual são utilizadas fêmeas (n=6 por dose), por serem mais

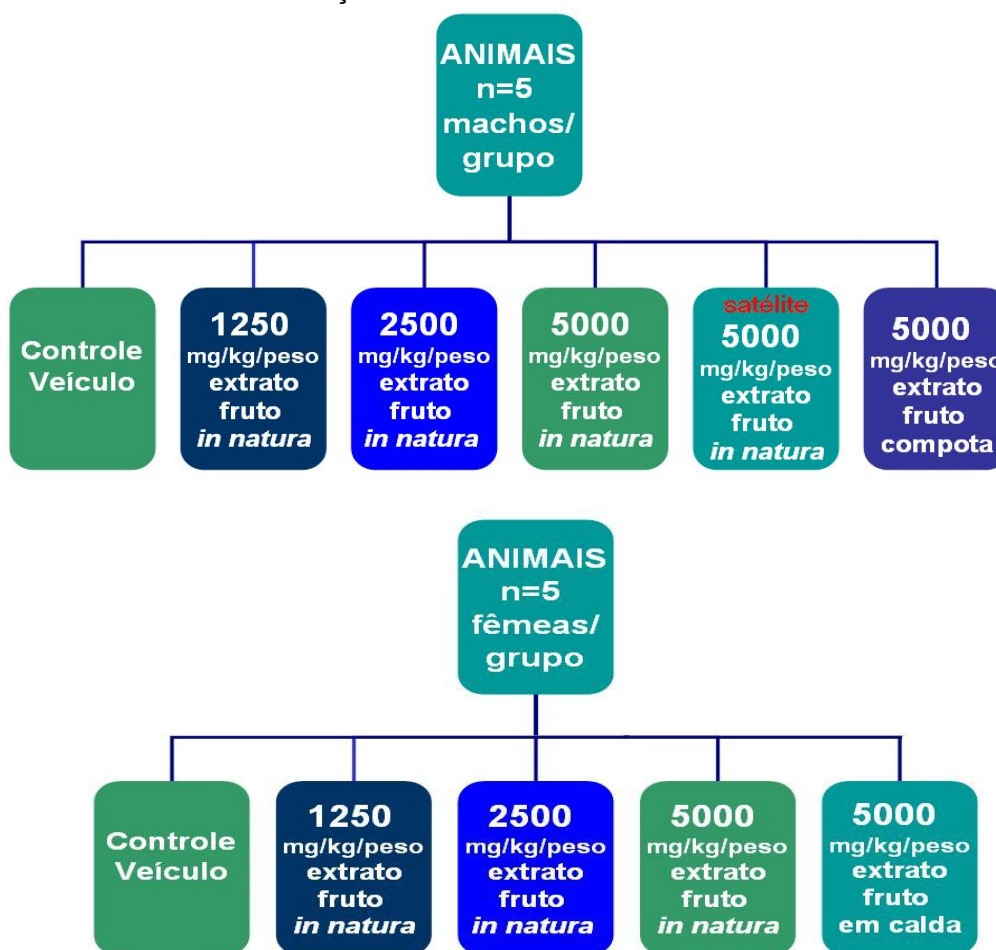
sensíveis. A técnica consistiu na administração em três animais de uma dose única de 2000 mg/kg do extrato (detalhamento 5.5.1), com o objetivo de verificar a capacidade em produzir mortalidade de 50% dos animais no período de 14 dias. Não tendo ocorrido morte de nenhum animal no período, foi administrada dose idêntica em outros três animais. Uma das três ações é requerida após a administração da dosagem inicial: parar no teste que atribui a classificação do risco apropriado, testar em uma dose fixa maior ou menor.

Não tendo ocorrido novamente morte de nenhum animal não foi necessária utilização de dosagens menores. Assim, realizou-se o mesmo procedimento na dosagem de 5000 mg/kg conforme padrões da *Globally Harmonized System* (OECD, 2001). Os animais receberam água e ração *ad libitum* durante o experimento.

b) Toxicidade subcrônica

A FIGURA 5 a seguir resume grupos e dosagens utilizadas no experimento para avaliação da toxicidade subcrônica.

FIGURA 5 – ESQUEMA DA FORMAÇÃO DOS GRUPOS DO ENSAIO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA



FONTE: a autora (2016)

Os animais foram divididos em seis grupos. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água destilada), três grupos de animais receberam o extrato bruto do fruto *in natura* nas doses de 1250, 2500 e 5000 mg/kg/dia durante 28 dias, e um grupo denominado satélite (constituído apenas por machos) que recebeu a dosagem de 5000 mg/kg/dia e permaneceu mais 14 dias sem tratamento antes da eutanásia a fim de verificar se haveria reversão ou permanência dos sinais de toxicidade. E por último um grupo com dose 5000 mg/kg/dia recebeu o extrato bruto do fruto em calda (detalhamento item 5.2). Todos os animais receberam o extrato ou veículo por gavagem e tiveram acesso à ração e água *ad libitum* (OECD, 2008; MARONE et al., 2008; BAKOMA et al., 2013; TRAESEL et al., 2014).

Os grupos das fêmeas foram divididos da mesma forma e receberam as mesmas dosagens, no caso de fêmeas não foi formado grupo satélite.

O ensaio com machos e fêmeas não ocorreu no mesmo período, porém foi realizado no mesmo ambiente sob as mesmas condições de tratamento e temperatura.

c) Parâmetros avaliados

Nos ensaio agudo e subcrônico os animais foram avaliados por um “*screening*” hipocrático (QUADRO 2), (adaptado de BRITO, 1994). Após a administração de cada dose nos tempos de 30 minutos, 1h, 2h, 4h, e a partir das 4 horas, diariamente após gavagem. Os sinais de toxicidade foram anotados, tabulados em escala de 0 a 3 (ausente, raros sinais, sinais evidentes, evidentes e contínuos). O peso dos animais foi avaliado diariamente no ensaio subcrônico (BRITO 1994; OECD, 2001; 2008).

QUADRO 2 - AVALIAÇÃO CLÍNICA PARA OBSERVAÇÃO DA TOXICIDADE NOS ENSAIO AGUDO E SUBCRÔNICO

OBSERVAÇÕES GERAIS	DESCRIÇÕES DOS SINAIS DE TOXICIDADE	PONTUAÇÃO BASAL
Hipnose Anestesia Lacrimação Pálpebras Micção e defecação Piloereção Hipotermia Cianose Respiração Tônus Atividade geral	Aparentemente dormindo (olhos fechados), mas em decúbito lateral o animal acorda Ausência de reflexos ao aperto da cauda Observar presença ou não de lágrimas Avaliar olhos abertos ou semi-cerrados Anotar se houver alguma alteração nítida Observar se os pelos estão eretos e a intensidade Verificar temperatura auricular Verificar coloração das orelhas, patas, narinas e cauda Aparentemente normal Observar tônus muscular normal Observar atividade normal – ou se se apresenta andando para trás ou em círculos	

Escores 0 – ausência do sinal, 1 – raros sinais, 2- sinais evidentes, 3- sinais evidentes e contínuos.

FONTE: adaptada de MALONE e ROBICHAUD, 1962; adaptada de BRITO (1994).

Para identificar os possíveis efeitos tóxicos dos extratos no ensaio subcrônico, uma hora após a última administração, os animais foram submetidos à avaliação motora por meio do teste denominado “campo aberto”. A metodologia utilizada foi descrita por Montrucchio (2012), a qual consiste na colocação do animal no interior de uma caixa de madeira (50x50cm) com o assoalho dividido em quadrados de tamanhos iguais (Figura 6). Após a colocação do animal na caixa, foram contabilizados os números de quadrados cruzados com as quatro patas, durante o período de seis minutos. (OECD, 2001; MONTRUCCHIO, 2012).

FIGURA 6 – CAIXA UTILIZADA NO TESTE CAMPO ABERTO



FONTE: A autora (2016).

Na sequência, os animais foram deixados em jejum, com água, durante 12 horas. No 29º dia os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg.) para a coleta de 1,0 ml de sangue (acondicionado 0,2 ml em tubo com EDTA e 0,8 ml em tubo seco). Assim, os animais morreram por exsanguinação e, quando necessário, seguido de deslocamento cervical.

Logo após a coleta de sangue os órgãos vitais – coração, pulmões, fígado, baço, rins, estômago – foram retirados, pesados e calculados em relação ao peso corporal. Dividindo o peso do órgão pelo peso do animal x 100 (SILVA et. al, 2013). Os intestinos também foram armazenados, porém o peso destes órgãos não foi comparado devido à diferença pelo acúmulo de resíduos.

Conforme metodologia da OECD (2008) a avaliação macroscópica dos órgãos constitui na observação em relação às alterações estruturais, contornos, mudança de coloração e aspectos anormais dos órgãos de animais submetidos ao ensaio subcrônico (OECD, 2008; SILVA, 2015). A análise macroscópica permite avaliar aspectos dos órgãos em que os exames laboratoriais bioquímicos não conseguem avaliar por suas limitações (MELO, 2009).

Na sequência os órgãos foram cortados e fixados em líquido ALFAC (álcool 85%, formaldeído 10% e ácido acético glacial 5%) durante 16 horas e posteriormente foram transferidos para álcool 70% onde permaneceram até o processamento histológico realizado no Laboratório de Biologia Adaptativa da Universidade Federal do Paraná. Os órgãos foram tratados de acordo com a rotina de técnica laboratorial, onde uma vez inseridos em cassetes. A desidratação dos órgãos ocorreu em série alcoólica crescente e a diafanização em xileno, para posterior inclusão das secções em parafina Paraplast Plus Sigma®. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo da marca Leica® Rm 2145, utilizando-se 5µm de espessura. Posteriormente foram corados pelo método Hematoxilina-eosina, onde a hematoxilina atua como corante em estruturas ácidas como o núcleo e citoplasma e a eosina em estruturas básicas, possibilitando a evidência de estruturas celulares e suas possíveis alterações. Após as análises histológicas as lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus PMAD (CLARK,1981; OECD, 1998, 2001, 2008; FISCHER et. al., 2006; SILVA, 2015).

As análises histológicas foram realizadas de forma cega quanto ao grupo experimental, para verificar a integridade dos órgãos, lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), congestão ou hemorragia sanguínea, necrose, fibrose, infiltração leucocitária, degeneração gordurosa e acúmulo de pigmentos biliares (BOULEY et.al, 2009 ; SCUDAMORE, 2014).

O sangue coletado com EDTA foi utilizado para avaliação de hematócritos, hemoglobina, eritrócitos, plaquetas, leucócitos totais e frações, por automação no aparelho Micros Horiba ABX® com kit específico da marca.

As amostras de sangue foram coaguladas em tubo seco e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos. O soro foi separado e utilizado para as avaliações bioquímicas por automação em aparelho Labmax 400® da Labtest ®. Quando foram analisados os parâmetros de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose, colesterol total, uréia, creatinina, em kit bioquímico específico da marca.

6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prisma®. (*Graphpad Prism 5.0 software Inc* La Jolla, CA, USA). Para avaliação de peso dos

órgãos, análises bioquímicas e hematológicas, foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via *one way* seguida do teste *Tukey*. Para avaliação do ganho de peso foi utilizado ANOVA de duas vias *two way* seguido do teste de *Bonferroni*. Para fins estatísticos considerou-se um nível de significância de 5%. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.

7 REFERÊNCIAS

ABREU, H. **Estudo nutricional, fitoquímico e biológico do “jaracatiá” (*Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC))**.80f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2015.

ABREU, H. ,LUIZ, C.G.G,MERINO,F.J.Z. ,FAGUNDES, C. ,SCHEMIKO, L.B. ,MIGUEL, O.G. , FERREIRA,S.M.R. Características toxicológicas da polpa madura de jaracatiá spinosa. Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. v 2, 2015.

AÇÃO BRASILEIRA PELA NUTRIÇÃO E DIREITOS HUMANOS - ABRANDH. **O direito humano à alimentação adequada e o sistema nacional de segurança alimentar e nutricional** / organizadora, Marília Leão. – Brasília: ABRANDH, 2013.

AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN. Líneas directrices del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) para la evaluación de los complementos alimenticios elaborados a base de componentes de origen vegetal y sus preparaciones. 2007.

AGRA, M.F, FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia** 17, 114-140, 2007.

AGUIAR, V. C. Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Fortaleza: UFC, 2006. 183 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará.

AGUIAR, F. L.; ALMEIDA, C. A.; CAMARGOS, L. S. A Caracterização Bioquímica da composição do cerne de Jaracatiá (*Jacaratia spinosa*). **Acta Iguazú**. Cascavel, v.1, n.4, p. 65 - 71, 2012

ALMANÇA, C.C.J; SALDANHA, V.S.; SOUSA, D.R.; TRIVILIN, L.O.; NUNES, L.C.; PORFÍRIO, L.C.; MARINHO, B.G.; Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. **Journal of Ethnopharmacology** 138, 508– 512, 2011

ANTONELLI-USHIROBIRA, E.N; KANESHIMA,M.; GABRIEL,E.A.; AUDI,L.C. MELLO,J.C.P. **Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents**. Food and Chemical Toxicology, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY(A.O.A.C). **Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 13 ed. Arlington, 2005.

AWODELE, O. ISHOLA, I.O. IKUMAWOYI, V.O. AKINDELE, A.J. AKINTONWA, A. Toxicological evaluation of the lyophilized fruit juice extract of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) in rodents. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, 2013.

BADILLO, V.M. Monografía de la familia Caricaceae. Asociación de profesores, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay. 1971

BALIGA, M. S.; JAGETIA, G. C.; ULLOR, J. N.; BALIGA, M. P.; VENKATESH, P.; REDDY, R.; RAO, K. V. N. M.; BALIGA, B. S.; DEVI, S.; RAJU, S. K.; VEERESH, V.; REDDY, T. K.; BAIRY, K. L. "The Evaluation of the Acute Toxicity and Long Term Safety of Hydroalcoholic Extract of Saptharma (Alstonia Scholaris) in Mice and Rats." **Toxicology Letters**, v.151, p.317-325, 2004.

BAKOMA, B.; BERKÉ, B.; EKLUGA-DEGBE, K. Acute and sub-chronic (28days) oral toxicity evaluation of hydroethanolic extract of Bridelia ferruginea Benth root bark in male rodent animals. **Food Chemistry Toxicology**, v. 1, p.176-179, 2013.

BARNES, D.G.; DOURSON, M., Reference dose: Description and use in health risk assessments. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.8, p.471-486, 1988.

BECK, B.D.; CLABRESE, E.S.; SLAYTON, T.M.; RUDEL, R. The use of toxicology in the regulatory process. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. Taylor e Francis, 5 ed, cap 2, 2008.

BETTI, A. H.; STEIN, A. C.; DALLEGRAVE, E.; WOUTERS, A. T. B.; WATANABE, T. T. N.; DRIEMEIER, D.; BUFFON, A.; RATES, S. M. K. Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of Hypericum polyanthemum Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. **Food and Chemical Toxicology** 2012; 50(7): 2349-2355.

BEZERRA, I. SCHNEIDER, S. Produção e consumo de alimentos: o papel das políticas públicas na relação entre o plantar e o comer. Revista faz ciência, 2013

BOULEY, D.; MEYERHOLZ, D.; SELLERS, R., BOYD, K., PERLE, K.L. Where's the mouse pathology training? **Veterinary Pathology**,46:1245–1247, 2009.

BRASIL. Resolução nº 12, de 1978.Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos nº 12, de 1978. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF. n.163, 24 jul 1978

BRASIL. Secretaria do Estado do meio Ambiente. **Lista Vermelha de Plantas Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná**. Curitiba.SEMA/GTZ 1995.

BRASIL. Decreto nº 4.339, de 22 de agosto de 2002. Institui princípios e diretrizes para a implementação da Política Nacional da Biodiversidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF. n.163, 23 ago. 2002.

BRASIL. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. **Ministério do Meio Ambiente Brasília: MMA/SBF**, 2002.

BRASIL. Lei Nº 11.346 de 16 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN com vistas em assegurar o direito

humano à alimentação adequada e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Lei nº 11.947 de 16 de junho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar e do Programa Dinheiro Direto na Escola aos alunos da educação básica. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes**. Gerência de Produtos Especiais – Gerência Geral de Alimentos. Brasília, 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL E COMBATE À FOME. **PAA: 10 anos de aquisição de alimentos**. Distrito Federal: MDS; Secretaria Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional; Secretaria de Avaliação e Gestão da Informação, 2014.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo**. Campinas: Editora Unicamp, 1994.

CARNEIRO, M. J.; DANTON, T. **Agricultura e biodiversidade nas Ciências Sociais brasileiras: alimentando a comunicação entre ciência e políticas públicas**. *Sociologias* [online]. 2012, vol.14, n.30, pp. 252-289. ISSN 1517-4522.

CASTRO, J.A. toxicologia básica mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.2: p.197-206, 1993.

CLARK, G., **Staining Procedures**. Baltimore: Williams & Wilkins Company 1981.

CALIXTO, J. B.; **Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for medicines (phytotherapeutic agents)**. *Braz j Med Biol Res*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, v. 2. Brasília, DF: Embrapa informações Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas: Editora Embrapa, 2006.

CAZELLA Ademir. A., BONNAL Philippe., MALUF, Renato. S. **Agricultura familiar: Multifuncionalidade e desenvolvimento territorial no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Mauad, Rio de Janeiro, 2009 p. 47-70.

CEPLAC. A. R. O. **Agricultura familiar e desenvolvimento sustentável**. 2013. Disponível em:< <http://www.ceplac.gov.br/radar/artigos/artigo3.htm>> . Acesso em: 10/02/2015.

CHIRANTHANUT, N.; TEEKACHUNHATEAN, S.; PANTHONG, A.; KHONSUNG, P.; KAN-JANAPOTHI, D.; LERTPRASERTSUK, N. Toxicity evaluation of standardized extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. **Journal of Ethnopharmacology** 2013; 149 (1): 228-234.

CONSEA. Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Princípios e Diretrizes de uma Política de Segurança Alimentar e Nutricional. **Relatório da II Conferência Nacional de SAN**. Olinda/PE. 2004. Brasília, julho 2004.

CONSEA. Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. **Relatório da III Conferência Nacional de SAN**. Fortaleza/CE. 2007. Brasília, julho 2007.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 403-411, 2009.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R.S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental; **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 103-111, 2010.

DONADIO, L.C. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Editora Novos Talentos, 2004.

FAUSTMAN E.M.; ALLEN B.C.; KAVLOCK, R.J.; KIMEL, C.A. Dose-response assessment for developmental toxicity: I. Characterization of database and determination of no observed adverse effect levels. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.23, p. 478-486, 1994.

FEDOROV, A. A. **Kromosomnye chisla tsvetkovykh rastenii: chromosome numbers of flowering plants**. Leningrad: Academy of Sciences USSR, 1969.

FISCHER, A. H.; JACOBSON, K. A.; ROSE, J.; ZELLER, R. **Basic Methods in Microscopy**. Spring Harbor Laboratory Press. NewYork, 2006.

FOLHA DE SÃO PEDRO. Festival de jaracatiá atrai e surpreende muitas pessoas. Disponível em <http://www.folhadesaopedro.com.br/festival-de-jaracatia-atrai-e-surpreende-muitas-pessoas/1555>, acesso 20/02/2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION- FAO- Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual, 20th ed., Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome, 2011, 213p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION- FDA **Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients**. 2007. e-book, Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/Redbook/default.htm>

FOWLER , J.S.L.; RUTTY, D.A. Methodological Aspects of Acute Toxicity Testing Particularly LD50 Determinations Present use in Development of New Drugs. **Basic and clinical pharmacology and toxicology**, v.52, p.20-30, 2009.

FRANCO MG. **Animais de laboratório - o camundongo**. 2006. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br/animais.htm>.

HOEHNE, F. C. **Frutas Indígenas**. Instituto de Botânica; Publicação da série “D”; Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio. São Paulo, SP, 1946.

HUNTER, R.P.; ISAZA, R. Concepts and issues with interspecies scaling in zoological pharmacology. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.39, n.4, p.517-526, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo, cap. 4, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS (IBRAF), 2009, ano 4, ed. 12.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Mapa de Biomas do Brasil e de Vegetação**. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: despesas, rendimentos e condições de vida**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Famílias Pobres no Paraná**. Curitiba: IPARDES; 2003.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). **Objetivos de Desenvolvimento do Milênio – Relatório Nacional de Acompanhamento**. Brasília, 2007.

KLAASSEN, C.D., CASSARETT AND DOULL'S. **Toxicology the Basic Science of Poisons**, 6 ed. McGraw-Hill, New York, 2006.

KHOO, Z. Y, TEH, C. ., RAO, N. K., & CHIN, J. H. Evaluation of the toxic effect of star fruit on serum biochemical parameters in rats. **Pharmacognosy Magazine**, 6(22), 120–124, 2010.

KINUPP, V. F. **Plantas Alimentícias não-convencionais da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS**. 562 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. UFRGS. 2007.

KINUPP, V. F; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias não-convencionais no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 768p. 2014.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNOK. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, v. 37, p. 370-378, 2004.

LAGARTO, A.; BUENO, V.; GUERRA, I.; VALDÉS, O.; VEGA, Y.; TORRES, L. Acute and subchronic oral toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. **Experimental and Toxicologic Pathology** 63 (4): 387-391, 2011.

LAHLOU, S.; ISRAILI, Z.; LYOUSSEI, B. Acute and chronic toxicity of alyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 221-227, 2008.

LEFF, E. **Saber Ambiental: sustentabilidade, racionalidade, complexidade, poder**. 3 ed. United Nations Environment Programme, Universidad Nacional Autónoma de México, PNUMA, 2002.

LEITE, E.M.; AMORIM, L.C.A. **Toxicologia Geral**. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

LLERAS, E. Caricaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6682>> Acesso em: 28/11/2014.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.20, p.297-301, 1992.

LEWINSOHN T. M.; PRADO, P. I. **Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, v. I, 2002.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, n.1, p. 36-42, 2005.

LIMA, J. L. S. O mamãozinho ou mamão de veados: importância e uso. Petrolina, PE: **Embrapa-CPATSA**. 1984. 5p

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MALONE, M.H., ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320 – 32, 1962.

MALONE, M. H; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natural products general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacology**, v. 8, p. 127-147, 1983.

MALUF, R. S. J. **Segurança Alimentar e Nutricional**. Petrópolis, RJ: Vozes, 2007.176 p.

MANETTI, L. M. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n.4, p. 406-413, 2010

MARTINEZ- CROVETTO, R. La alimentación entre los indios guaraníes de Misiones (Republica Argentina). **Etnobiología**. Corrientes, n.4, p.1-24, 1968.

MARONE, P.A BORZELLECA, J.F. MERKEL, D. HEIMBACH, J.T. KENNEPOHL, E. Twenty eight-day dietary toxicity study of Luo Han fruit concentrate in Hsd:SD® rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.910-919, 2008.

MELO, M. G. D. **Caracterização Físico-química, Avaliação dos efeitos antinoceptivos, redox ativo e da toxicidade da antranorina extraída da *Cladina kalbii* Ahti**. [Dissertação de Mestrado]. Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Pós-graduação em Ciências da Saúde; 2009.

MIGLIATO, M.A.T.CHAGAS, A.C.S. CARVALHO, C. O. OLIVEIRA, M. C. de S. **Avaliação da toxidade de solventes e emulsificantes utilizados em experimentos com fitoterápicos sobre ovos de nematóides gastrintestinais de ovinos**. São Paulo: Embrapa, 2007.

MITTERMEIER, R.A.; GIL P.R., MITTERMEIER, C.G. **Megadiversity: Earth's Biologically 344 Wealthiest Nations**. Conservation International, Cemex. Washington, 1997.

MONTRUCCHIO, D.P. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcalóide S-(+)-dicentrina extraído de frutos de *Ocotea puberula* (Lauraceae)**. Tese (Doutorado em farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

MORAIS, L.; BORGES, A. **Novos paradigmas de produção e consumo : experiências inovadoras**. Instituto Pólis, São Paulo, 2010.

MUKINDA, J. T; SYCE, J. A. Acute and Chronic Toxicity of the Aqueous Extract of *Artemisia Afra* in Rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 138-144. 2007.

MORGAN, K; SONNINO, R. Repensando a alimentação escolar: o poder do prato público. In: WORLDWATCH INSTITUTE. **Estado do Mundo: transformando culturas – do consumismo à sustentabilidade**. Bahia, p.72-78, 2010.

MOURA, N. S.; VASCONCELOS, A. C. M.; BERNABÉ, B. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; SARAIVA, S. H. Ensaio toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**. v.8 p.1945-1959, 2012.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. Guideline 407: **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodent**, 1995.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. Guideline 408: **Repeated Dose 90 -day Oral Toxicity Study in Rodent**, 1998.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method.** Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents...**, Paris, 2008.

OLIVEIRA, N. R. F. **Sabores na história um estudo a partir dos saberes e fazeres alimentares de agricultores familiares de Jaboticaba – RS.** Dissertação de mestrado – UFSM, 2009.

OLSON, *et al.* **Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and Animals.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32: 56-67, 2000.

OSBORNE, D. R.; VOOGT, P. **The analysis of nutrient in foods.** London: Academic Press, p. 251, 1978.

PAGÁN, O. R., ROWLANDS, A. L. URBAN, K. R. Toxicity and Behavioral Effects of Dimethylsulfoxide in Planaria. **Neuroscience Letters**, v. 407, p. 74-278, 2006

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal Pharmacology Pharmacotherapeutics**. v.2, p.74-79, 2011.

PATEL, C.; DADHANIYA P.; HINGORANI L.; SONI, M. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. **Food Chemical Toxicology**, v.46, p. 2728–2735, 2008.

PEREIRA, E. M. ; PASQUALETO, A. **Desenvolvimento sustentável com ênfase em frutíferas do cerrado.** Estudo, Goiânia, v.38, n.2, p. 333-363, abril/junho 2011.

PERK, B. O; *et. al.* **Acute and Subchronic Toxic Effects of the Fruits of *Physalis peruviana* L.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 707285. New York: Hindawi Publishing Corporation, 2013.

PORTO, L. C.; SILVA, J.; FERRAZ, A. B. F.; CORRÊA, D. S.; SANTOS, M. S.; PORTO, C. D. L.; PICADA, J. N. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. **Food and Chemical Toxicology** 59: 579-585, 2013.

PRESCOTT-ALLEN, R. **Assessing progress toward sustainability: the system assessment method illustrated by wellbeing of nations.** UICN, 1999

PRÓSPERO E. T. P. **Caracterização da fruta *Jacaratiá spinosa* e processamento do doce de jaracatiá em calda com avaliação da estabilidade.** 137f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

RAJESH, R.; NATARAJU. A.; GOWDA, C. D. R.; FREY, B. M.; FREY, F. J.; VISHWANATH, B. S. **Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable**

glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. *Biochimie*, v. 88, p. 1313–1322, 2006.

REIGNER, B.G. BLESCH, K.S, Estimating the Starting Dose for Entry into Humans: Principles and Practice, **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.57, 835-845, 2002.

RESEARCH DEFENCE SOCIETY AND COALITION FOR MEDICAL PROGRESS-RDSCMP. Medical advances and animal research. **The contribution of animal science to the medical revolution: some case histories**. London, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. International Life Sciences Institute Press 2001.

SANTOS, B.F Criação e Manejo de Camundongos In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 115- 118.

SANTOS, A.P.; COSTA, I. B.; ANJOS, M. C. R. O desafio da inserção da agroecologia em programas brasileiros de segurança alimentar e nutricional. In: VII Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2011, Fortaleza. **Cadernos de Agroecologia**, v.6. Fortaleza, 2011.

SCHWEIGGERT, R., M.; STEINGASS, C., B.; MORA, E.; ESQUIVEL, P.; CARLE, R. Carotenogenesis and physic-chemical characteristics during maturation of red fleshed papaya fruit (*Carica papaya* L.). *Food Research Intern.* 1373– 1380. 2011.

SEMA Paraná (Secretaria de Estado do Meio Ambiente). 1995a. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná**. Curitiba: SEMA/GTZ.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 7 ed. São Paulo, Livraria Varela, 2014.

SILVA NETO, R. M.da. **Doce de frutas em calda** - Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

SILVA, R. O.; Andrade VM, Bullé Rêgo ES. Avaliação da Toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 170, 2015. p. 66 -71.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS, 2007.

SOUZA, G.S. **Tratado descritivo do Brasil em 1587**. 3 ed. São Paulo, Companhia editora Nacional e Editora da USP, 1938.

SCUDAMORE C. L. **A Practical Guide to Histology of the Mouse**. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 2014.

TAUNAY, V. de. **Memórias**. Edição de Sérgio Medeiros. São Paulo, Iluminuras, 2004

TRAESEL, K.G.; SOUZA, J.C.; BARROS, A.L.; SOUZA, A.M.; SCHMITZ, W.O.; MUZZI, R. M.; OESTERREICH, S.A.; ARENA, A.C. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.74, p. 320-325, 2014.

TROPICOS.org. *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC. **Jardim Botânico de Missouri. Missouri Botanical Garden** - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 8063110. 2013. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/6100046>>. Acesso em: 02/10/2014.

WOLFENHSON, S. & LLOYD, M. **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. Oxford: Oxford University Press, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2000. **Guidelines for the preparation of toxicological working papers for the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives** - Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Risk assessment and its role in risk analysis**. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food- Geneva, 2009.

8 ARTIGO 1 : Avaliação da toxicidade aguda e sub-crônica do extrato de fruto selvagem brasileiro, Jaracatiá spinosa, em camundongos

Submetido ao Journal of Ethnopharmacology

Cellen Giacomelli Groth Luiz^a, Gabriela Moraes Fortuna^b, Railson Renneber^c, Rubens Bertazolli Filho^d, Deise Montrucchio^c, Elizabeth do Nascimento^e, Mônica de Caldas Rosa dos Anjos^f, Sila Mary Rodrigues Ferreira^a

a Universidade Federal do Paraná (UFPR). Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil.

b Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curso de Graduação em Nutrição. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil.

c Universidade Federal do Paraná (UFPR). Departamento de Farmácia. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil.

d Universidade Federal do Paraná (UFPR). Departamento de Biologia Celular. Centro Politécnico 81531-990. Curitiba, Paraná, Brasil.

e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Programa de Pós-graduação em Nutrição. Cidade Universitária. 50670-901 Recife, Pernambuco, Brasil.

f Universidade Federal do Paraná (UFPR). Departamento de Nutrição. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil.

Resumo

O Jaracatiá spinosa é um fruto alimentício não convencional rico em látex. Apesar do uso por algumas comunidades brasileiras, sua toxicidade não foi cuidadosamente testada.

Objetivos do estudo: Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do extrato aquoso de Jaracatiá spinosa (EJ) administrado por via oral em camundongos.

Material e métodos: Camundongos Swiss foram tratados oralmente com EJ em ensaio agudo (2000 e 5000 mg / kg) e subcrônico (1250, 2500 e 5000 mg / kg) por 28 dias de acordo com as diretrizes da OECD 423 e 407, respectivamente.

Resultados: Em ensaio agudo o EJ não produziu efeitos letais nas doses 2000 e 5000mg/kg. Em ensaio subcrônico foram identificados sinais de piloereção, aumento no número de bolos fecais, aumento do peso relativo de estômago.

Nas análises laboratoriais destacam-se aumento de ALT, aumento na contagem de plaquetas e alterações histológicas em estômago e fígado.

Conclusões: Em ensaio agudo com EJ não foram observados efeitos tóxicos, já no uso subcrônico do por 28 dias produziu efeitos tóxicos em camundongos.

8.1 Introdução

A espécie nativa *Jacaratia spinosa*, pertencente à família *Caricaceae*, está distribuída em países da América do Sul (Trópicos, 2013). No Brasil, seu cultivo predomina entre o sul da Bahia e o Rio Grande do Sul (Aguilar et al., 2012). De acordo com Badillo (1971), o *J. spinosa* teve várias denominações, sendo conhecido *J. actinophylla*, *Papaya spinosa* e *Carica spinosa*, entre os anos de 1775 e 1889, como *J. dodecaphyllae*, em 1902 e como *J. costarricensis*, em 1924.

O *Jaracatiá spinosa* foi referenciado no tratado descritivo do Brasil em 1587, sendo predominante no bioma Mata Atlântica, e encontrado também na Amazônia e Cerrado (Souza, 1938; Tropicos, 2013). Seu nome deriva da palavra yara-cati-á, de origem indígena que significa fruto cheiroso (Souza, 1938).

O jaracatiá é considerado uma planta alimentícia não convencional, pertencente à família *caricaceae*, que frutifica uma vez ao ano, entre os meses de janeiro a março. Algumas comunidades tradicionais preparam doces do fruto e do caule para consumo. O doce é considerado patrimônio cultural brasileiro (Prospero, 2010; Kinupp e Lorenzi, 2014) e seu consumo tem ganhado importância como alimento na dieta habitual. No sudeste do país como a ocorrência do Festival do Jaracatiá tem incrementado sua inserção na alimentação por meio de preparações como sorvetes, bolos, pão de mel, amanteigados, compotas, bombons e *cupcakes*. O fruto é rico em ferro e tem sido utilizado empiricamente pela população local para o tratamento da anemia (Próspero 2010). Também, possui dois compostos antioxidantes, o β - sitosterol e campesterol que estão intimamente ligados à propriedade antioxidante de alimentos (Abreu, 2015).

O fruto, mesmo no estágio maduro, apresenta quantidade significativa de látex, superior, inclusive, ao fruto imaturo de mamão. Etnofarmacologicamente o látex do jaracatiá é apontado como anti-helmíntico, alertando-se, no entanto, que o consumo excessivo pode provocar hipertemia (Hoehne, 1946). O fruto é popularmente utilizado como cataplasma em feridas e seu suco, indicado para problemas estomacais. Há relatos de que o abuso na ingestão de frutos crus pode provocar desconforto abdominal e edema labial (Hoehne, 1946; Correia, 1984). Alguns autores sugerem que a utilização do fruto *in natura*, deve ser precedida de incisões longitudinais a fim de drenar parcialmente o látex, e que seu consumo por índios guaranis ocorre após os frutos estarem cozidos ou braseados (Martínez-

Crovetto, 1968; Kinupp e Lorenzi, 2014). Estudos prévios com o uso do fruto demonstrou uma hemólise positiva em sangue de carneiro e toxicidade positiva no teste *Artemia salina*, o que sugere uma investigação toxicológica *in vivo* à espécie estudada de modo a averiguar a segurança no uso do fruto como fonte alimentar (Abreu, 2015).

Evidências toxicológicas apontam que toda substância é potencialmente tóxica, conforme a dose administrada, absorvida e o tempo de exposição (FDA, 2007; Khoo, 2010). Desta forma, uma planta não convencional deve ter sua ação e nível tóxico previamente avaliado a fim de verificar a segurança em relação ao seu consumo. O uso popular e o tradicional dessa planta, não são suficientes para validá-la como segura (WHO, 2000; FDA, 2007). Mesmo com poucos estudos registrados na literatura, a população tem aumentado seu consumo. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito tóxico da administração oral do extrato bruto de jaracatiá spinosa, *in natura*, utilizando protocolo internacional para ensaios agudo e subcrônico em camundongos

8.2 Materiais e métodos

8.2.1 Frutos

Os frutos de *Jaracatiá spinosa* foram coletados em Rolândia, Paraná, Brasil (S- 23°14'48" / W- 51°24'43") em fevereiro de 2015. A determinação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Paraná, Brasil, por meio da exsicata de nº. 379131. O acesso de remessa da amostra de componente do patrimônio genético foi autorizado pelo *National Counsel of Technological and Scientific Development* sob nº. 010004/2015-7.

8.2.2 Análises e preparação dos extratos

Os frutos no estágio maduro, com pelo menos 75% da casca de cor alaranjada, foram selecionados, lavados e higienizados. Para a análise física foram utilizados frutos inteiros, em quintuplicata de cem frutos.

Posteriormente, os frutos foram submetidos à retirada do pedúnculo e separação da casca, polpa e sementes. A polpa foi triturada em multiprocessador Arno®, congelada (- 18°C) e liofilizada (- 20°C).

A análise química, realizada em triplicata, envolveu a determinação da umidade do fruto *in natura*, e demais análises (proteínas totais, lipídios, fibras alimentares totais) foram realizadas com fruto liofilizado, carboidrato foi calculado por diferença (AOAC, 2005).

Para os ensaios com os animais foi utilizado o extrato de Jaracatiá (EJ), preparado diariamente, diluindo-se a polpa do fruto liofilizado em água destilada e acrescentando-se emulsificante *tween* 80 (5%). Considerando a ingestão de 3, 6 e 12 frutos/dia para um adulto com 65 kg, foram preparadas concentrações de 1250 mg/kg, 2500 mg/kg e 5000 mg/kg (v/v) para administração via oral (Hor et al., 2012).

8.2.3 Ensaios biológicos

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da espécie *Mus musculus* e linhagem *swiss*, com oito semanas de idade e pesos entre 25 e 35g. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno opacas, agrupados, em três para ensaio agudo e cinco animais, para ensaio subcrônico. As gaiolas foram forradas com maravalha e mantidas em sala climatizada, com temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a ração e água potável *ad libitum*. Os animais foram ambientados às condições do laboratório por sete dias antes do início do experimento (Damy et. al., 2010).

Para o teste de toxicidade aguda, foram utilizados apenas camundongos fêmeas (n=12) desmamadas (peso entre 25 - 35g), mantidas nas mesmas condições ambientais (OECD, 2001).

Em ambos os ensaios foram avaliados os sinais comportamentais e fisiológicos, como: mudanças na pele, pêlos, olhos, mucosas, respiração, tônus muscular, atividade motora, convulsão, salivação, diarreia, letargia, temperatura corporal e peso. Na avaliação da piloereção foram definidos quatro graus, sendo eles: ausência de sinais, raros sinais, sinais evidentes, sinais evidentes e contínuos (Malone e Robichaud, 1983, OECD, 2001; 2008).

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA, da Universidade Federal do Paraná sob nº. 869. Todo o experimento

ocorreu em conformidade com os princípios definidos pelas Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, obedecendo aos preceitos da legislação vigente (Brasil, 2008).

8.2.3.1 Ensaio toxicológico agudo

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados conforme metodologia OECD 423 (2001) onde são utilizadas apenas fêmeas (n=6 por dose), por serem mais sensíveis. A técnica consistiu na administração em três animais de uma dose única de 2000 mg/kg do extrato, com o objetivo de verificar a capacidade em produzir mortalidade de 50% dos animais no período de 14 dias. Não tendo ocorrido morte de nenhum animal no período, foi administrada uma dose idêntica em outros três animais. Uma das três ações é requerida após a administração da dosagem inicial: parar no teste que atribui a classificação do risco apropriado, testar em uma dose fixa maior ou menor.

Não tendo ocorrido novamente morte de nenhum animal pode ser realizada dosagem de 5000 mg/kg conforme os padrões da *Globally Harmonized System* (OECD, 2001). Durante todo o experimento os animais receberam água e ração *ad libitum*.

8.2.3.2 Ensaio toxicológico subcrônico

O teste de toxicidade subcrônica foi conduzida com 40 animais, separados em quatro grupos, sendo cinco de cada sexo por grupo, durante 28 dias, conforme metodologia do OECD 407 (OECD, 2008).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle, que recebeu apenas o veículo (água destilada e tween 80 - 5%) e, três grupos que receberam o extrato do fruto *in natura* nas doses de 1250, 2500 e 5000 mg/kg/dia, respectivamente. Os animais foram avaliados diariamente conforme descrito no item 2.3.

No 28º dia, após a administração da última dose, aguardou-se 60 minutos para a realização do teste de atividade locomotora denominado campo aberto, que consistiu na colocação do animal no interior de uma caixa de madeira (50x50cm) com o assoalho dividido em quadrados de tamanhos iguais. Foram contabilizados os

números de quadrados cruzados com as quatro patas, durante o período de seis minutos (OECD, 2001; Montrucchio, 2012).

No 29º dia, os animais após terem sido submetidos a jejum de 12 horas com permanência de água *ad libitum*, foram encaminhados para procedimento de coleta de sangue, o qual foi distribuído 0,2 ml em tubo com EDTA e 0,8 ml em tubo seco. A seguir os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). O sangue total foi utilizado para análise hematológica por automação (Micros Horiba ABX®) de acordo com os procedimentos padrões. A leitura das lâminas hematológicas foi realizada utilizando microscópio ótico. As análises bioquímicas foram realizadas por automação (Labmax 400® da Labtest ®) em soro, após centrifugação do sangue coagulado a 3.500 rpm por 10 minutos. Foram analisadas as funções hepáticas (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT, fosfatase alcalina), renais (uréia, creatinina, ácido úrico) e outros parâmetros bioquímicos (glicose e colesterol total) com kit específico Labtest ®.

A eutanásia dos animais ocorreu por exsanguinação ou deslocamento cervical quando necessário. Em seguida, órgãos vitais, como: pulmões, fígado, baço, rins, estômago e intestinos foram retirados, pesados e examinados macroscopicamente. O peso relativo do órgão foi calculado como base na equação: (órgão/peso corpo) x100.

Na sequência, os órgãos foram cortados e fixados em solução formalina (10%), desidratados, diafanizados, inclusos em parafina e cortados em 5µm de espessura com micrótomo da marca Leica® Rm 2145. Posteriormente foram corados pelo método da hematoxilina de Harris, e fotografados em fotomicroscópio Zeiss (Axio LabA1), acoplado a câmera Axiocam ERc5s e, processados no programa ZEN Digital Imaging. Todas as análises microscópicas foram realizadas de forma cega em relação aos grupos. As amostras de tecidos foram avaliadas estruturalmente observando lesões, congestão ou hemorragia, necrose, fibrose, infiltração leucocitária, degeneração gordurosa e acúmulo de pigmentos biliares.

8.2.4 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prisma®.

(*Graphpad Prism 5.0 software Inc* La Jolla, CA, USA). Para avaliação de peso dos órgãos, análises bioquímicas e hematológicas, foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via *one way* seguida do teste *Tukey*. Para avaliação do ganho de peso foi utilizado ANOVA de duas vias *two way* seguido do teste de *Bonferroni*. Para fins estatísticos considerou-se um nível de significância de 5%. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.

8.3 Resultados e discussão

8.3.1 Caracterização dos frutos

Os frutos do jaracatiá são carnosos indeiscentes, ovalados ou piriformes, em forma de bagas, tendo o aspecto físico e sementes similares ao mamão *papaya*.

Os frutos apresentaram uma massa média de 58,263g ($\pm 15,483$) e um comprimento 6,94cm ($\pm 0,91$). A caracterização química mostrou uma umidade de 85,43% ($\pm 0,641$), proteínas totais 2,35 % ($\pm 0,061$), lipídeos 0,17% ($\pm 0,001$), carboidratos 11,13 % ($\pm 0,652$) e fibras alimentares de 4,47% ($\pm 0,021$).

8.3.2 Ensaio toxicológico agudo

A administração do EJ não produziu efeitos letais, nas doses 2000 mg/kg e 5000mg/kg. A piloereção e as fezes amolecidas foram persistentes até o 3º dia em 100% dos animais que receberam doses 2000mg/kg e 5000mg/kg. Dos animais do grupo 2000 mg/kg, 50% diminuíram a deambulação nas primeiras 2 horas e 50% dormiram. Após a administração da gavagem os animais apresentaram contrações na região abdominal evidenciando sinais de cólicas. Como também, apresentaram o ato de se limpar pós gavagem. Nenhum efeito tóxico foi detectado após o 3º dia. De acordo com os critérios da OECD (2001) ao utilizar dose de 5000mg/kg e na ocorrência de óbito de até um animal, o produto é classificado em GHS 5. Portanto, como não houve óbito de animal nessa dosagem o DL₅₀ para fruto *in natura* de *Jaracatiá spinosa* foi acima de 5000 mg/kg caracterizando de relativamente baixa a toxicidade aguda(OECD, 2001; UNECE,2011).

8.3.3 Ensaio toxicológico subcrônico

8.3.3.1 Sinais clínicos

Durante o tratamento com EJ nenhuma morte foi observada. Foram observados sinais de diminuição na deambulação, ato de limpar-se e sinais de contrações abdominais, caracterizando cólicas em 100% dos animais tratados. O teste de avaliação motora em campo aberto não mostrou diferença estatística entre os grupos tratados e controle. Em relação à evacuação, os animais tratados demonstraram aumento no número de bolos fecais em relação ao grupo controle. Esse acréscimo foi gradativo à dose utilizada, tanto para machos quanto para fêmeas. No grupo 1250 o número de bolos fecais em relação ao grupo controle aumentou 77,4% para fêmeas e 90,6% entre os machos. Na dose 2500 o aumento foi de 109,6% e 139,6%, para fêmeas e machos, respectivamente. Na dosagem 5000 aumentou em 151,6% para o número de bolos fecais em fêmeas e 254,7% para os machos. Além do aumento no número de bolos fecais, observou-se o amolecimento das fezes e bolos fecais 30% maiores em relação ao diâmetro.

Postulamos que o aumento da frequência de fezes e alteração da consistência deve-se a composição química do fruto, sobretudo a presença do látex. Holstege (2005) evidencia em seus achados que as plantas do gênero *Solanum*, que são lactescentes como o jaracatiá, quando em exposição crônica, pode produzir diarreia em humanos. Os mecanismos propostos são devido às antraquinonas, presentes no látex, as quais atuam no canal de cloro da membrana celular, bloqueando a absorção de eletrólitos na mucosa do intestino grosso e causando um aumento da pressão local e do peristaltismo intestinal. Almança et al., (2011) da mesma forma, descreve diarreia em ratos que receberam 1,4g/kg do extracto hidroalcolico de *Solanum cernuum* em ensaio subcrônico.

Não houve alterações em relação à temperatura, sinais de cianose, lacrimações, hipnose e anestesia. Em relação à piloereção, observou-se um efeito dose-resposta, ou seja, um aumento gradativo da ereção dos pelos conforme o aumento da concentração das doses. No grupo controle, 17% das fêmeas e 8% dos machos apresentaram sinais raros de piloereção, demais no grupo não apresentaram alteração em pelos. No grupo 1250, 8% dos machos e 33% das fêmeas apresentaram sinais evidentes de piloereção e 92% machos e 67% sinais

evidentes e contínuos na ereção dos pelos. Para as doses de 2500 e 5000, ambos os gêneros apresentaram sinais evidentes e contínuos de piloereção em todos os animais do grupo. Esses resultados corroboram estudo prévio que utilizou extrato hidroalcolico de *Solanum cernuum* nas dosagens 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 25g/kg em ratos, evidenciando sinais intensos de piloereção (Almança et al, 2011).

8.3.3.2 Ganho de peso

Na primeira semana do experimento, os animais apresentaram diferenças estatísticas importantes no ganho de peso (Figura 1) em relação ao grupo controle, período em que alguns demonstraram perda de peso. Postulamos que ao longo das semanas houve adaptação do organismo à utilização do extrato, assim em suma, as maiores diferenças encontradas no peso corporal ocorreu em machos, os quais ganharam mais peso em relação ao grupo controle. A maior preocupação em ensaios histológicos seria a perda ou baixo ganho de peso, fato que isoladamente já poderia ser um indicativo de toxicidade, o que não foi observado no decorrer das quatros semanas de ensaio (OECD, 2008).

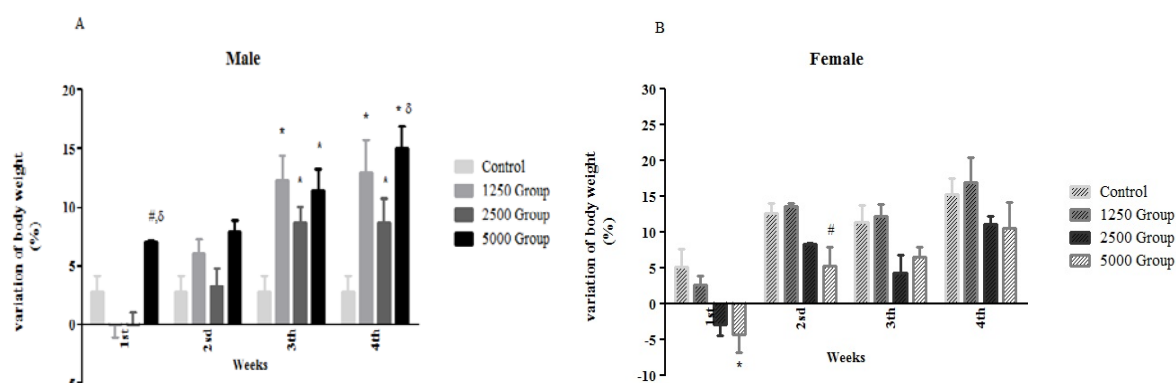


Fig. 1.

Variação percentual do peso corporal de machos (A) e fêmeas (B) segundo os tratamentos realizados. Teste *two way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.. Dados apresentados em média e desvio padrão da média. * $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs 1250; δ $p < 0,05$ vs 2500.

8.3.3.3 Peso dos órgãos

A administração oral do extrato de *Jaracatiá* promoveu aumento significativo no peso do estômago dos grupos 2500 e 5000 em machos ($p = 0,0018$) e fêmeas ($p = 0,0083$) comparados ao grupo controle (Figura 2). Na macroscopia gástrica de

machos e fêmeas dos grupos 1250, 2500 e 5000 foi observado hiperemia em 100% dos animais, com espessamento da parede gástrica, o que sugere injúria química (Odze e Goldblum, 2009). Em estudo realizado por Boudreau et al., (2013), verificou-se hiperplasia de estômago em camundongos que consumiram extrato de Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) não purificado (nondecolorized) ou seja, extrato bruto rico em látex.

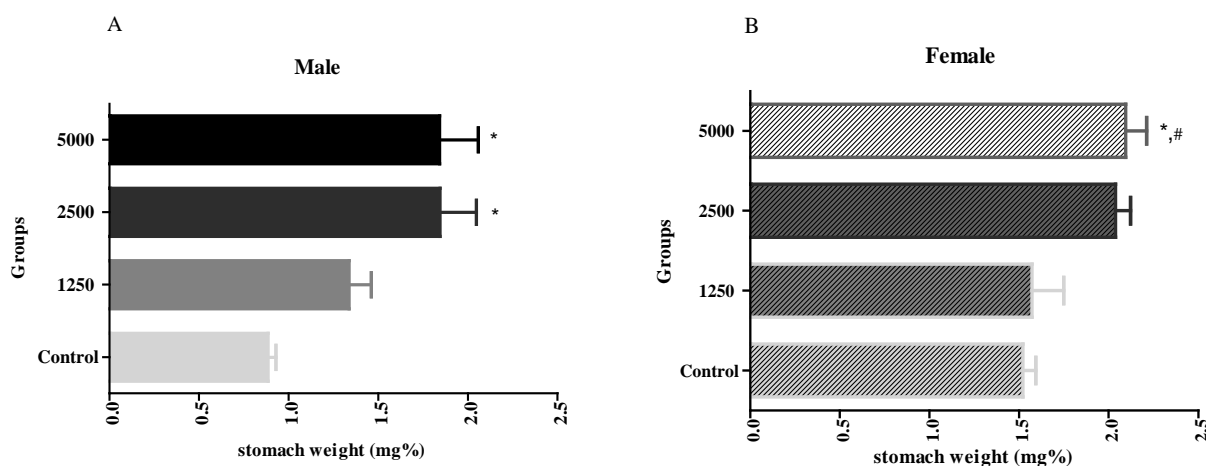


Fig. 2.

Peso relativo do estômago (peso estômago/peso corporal %) machos (A) e fêmeas (B), grupos controle e grupos tratados com extrato de Jaracatiá spinosa por 28 dias nas doses 1250, 2500 e 5000 mg/kg/dia. Dados apresentados em média e desvio padrão da média. * $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs 1250 ANOVA one way (Tukey test)

Aumento no peso da massa renal (Tabela 1) foi observado em fêmeas na dose de 5000 quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0314$). Nos machos, ocorreu diminuição da massa renal no grupo 2500 ($p = 0,048$). Luyong et al. (2004) relataram aumento de peso em rins por infiltrado inflamatório em animais que consumiram antraquinonas proveniente de ruibarbo. Estudo prévio avaliando a toxicidade do *Aloe vera*, registrou a diminuição da massa renal em fêmeas que receberam a dosagem de 4% durante um ano de uso, essas diferenças nos pesos de rins, especificamente, foram atribuídas às variações no grau de hidratação dos animais, visto que causa efeitos laxativos (Matsuda et al., 2008).

Para os demais órgãos avaliados, nenhuma alteração no peso relativo foi observada. Wattanathorn et al. (2012) ao pesquisarem a toxicidade de outros frutos exóticos como extrato aquoso de amoras (*mulberry fruits* - *Morus alba*) não encontraram alterações de peso em órgãos de ratos Wistar. Silva et al. (2015)

obtiveram aumento no peso de pulmões em machos tratados com 200 mg/kg de extrato hidroetanólico de própolis vermelha brasileira e no baço de animais tratados com 100 mg/kg sugerindo algum grau de toxicidade do produto.

Tabela 1 - Efeitos do uso oral do extrato de *Jaracatia spinosa* no peso relativo dos órgãos (peso órgão/peso corporal%) em fêmeas e machos de camundongos *Swiss* tratados por 28 dias consecutivos.

Órgão (mg %)	Fêmeas (n=5)				Dose (mg/kg/day)	p-valor
	Controle	1250	2500	5000		
Fígado	38.49 ^a ± 4.09	44.04 ^a ± 2.94	43.17 ^a ± 5.60	42.04 ^a ± 4.83		0.2092
Baço	4.14 ^a ± 0.30	3.67 ^a ± 0.25	3.82 ^a ± 0.84	3.44 ^a ± 0.67		0.2062
Rins	9.88 ^a ± 0.67	11.26 ^{ab} ± 1.34	12.16 ^{ab} ± 2.09	12.22 ^b ± 1.33		0.0314
Coração	3.89 ^a ± 0.23	4.29 ^a ± 0.35	4.71 ^a ± 0.89	4.64 ^a ± 0.54		0.0734
Pulmões	5.33 ^a ± 0.65	5.39 ^a ± 0.53	6.15 ^a ± 0.52	5.73 ^a ± 0.26		0.0557

Órgão (mg %)	Machos (n=5)				Dose (mg/kg/day)	p-valor
	Controle	1250	2500	5000		
Fígado	41.57 ^a ± 2.72	38.56 ^a ± 1.82	38.60 ^a ± 5.23	38.72 ^a ± 1.35		0.7175
Baço	2.99 ^a ± 0.37	2.78 ^a ± 0.38	3.10 ^a ± 1.07	3.17 ^a ± 0.49		0.8072
Rins	14.34 ^a ± 1.02	13.87 ^a ± 1.74	10.93 ^b ± 2.16	13.59 ^a ± 0.17		0.0483
Coração	4.81 ^a ± 0.38	4.61 ^a ± 0.34	4.41 ^a ± 0.35	4.84 ^a ± 0.31		0.0547
Pulmões	5.70 ^a ± 0.34	5.79 ^a ± 1.12	5.24 ^a ± 0.72	5.34 ^a ± 0.53		0.6832

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Valores representados em média e \pm desvio padrão. ANOVA one way (teste Tukey).

8.3.3.4 Avaliações hematológicas

Foram observados aumentos na contagem do número de plaquetas em machos ($p < 0.0001$) e fêmeas ($p = .0003$) dos grupos 1250, 2500 e 5000 comparados ao grupo controle (Figura 3). Esses valores correspondem aos padrões de referência estabelecido por Restell et al. (2014). Porém, sendo as plaquetas células inflamatórias com importante papel na defesa do organismo, desordens plaquetárias, podem ocorrer primariamente em resposta à hemorragia aguda ou ainda trombocitose reativa, secundária à inflamação. Também, doenças crônicas, desordens no trato digestório ou endócrinas, bem como danos teciduais podem ser causas de trombocitose (Bleeker e Hogan, 2011; Rose et al., 2012).

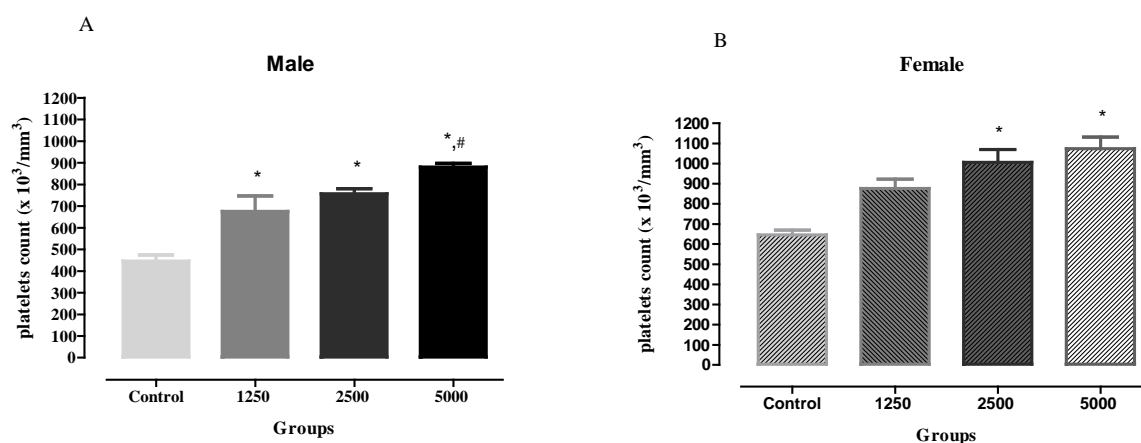


Fig. 3

Contagem de plaquetas machos (A) e fêmeas (B), grupos controle e grupos tratados com extrato de Jaracatiá spinosa por 28 dias nas doses 1250, 2500 e 5000 mg/kg/dia. Dados apresentados em média e desvio padrão da média. * $p < 0,05$ vs Control; # $p < 0,05$ vs 1250 ANOVA one way (Tukey test)

Os resultados corroboram estudos prévios como o de Voss e Brennecke (1991) que observaram trombocitose em ensaio subcrônico, por mais de 30 dias, com ratos tratados com *Cassia obtusifolia* (0,50%). Esses autores atribuíram a toxicidade observada à antraquinona presente no látex. Igualmente, em ensaio subcrônico realizado com extrato bruto de folhas de *Carica papaya* aumentou significativamente a contagem plaquetária do grupo tratado (Dharmarathna et al., 2013). Os neutrófilos segmentados elevaram nos grupo 2500 e 5000 em ambos os gêneros, sem dúvida sendo os principais agentes da inflamação aguda, indicando

que eles também contribuem para condições inflamatórias crônicas e de respostas imunitárias adaptativas (Kolaczowska e Kubes, 2013).

Quanto aos demais parâmetros hematológicos, não foram observados nenhuma diferença entre os grupos (Tabela 2). Similar ao nosso estudo, Hor et al. (2011) em ensaio subcrônico utilizando as mesmas dosagens (1250, 2500 e 5000 mg/kg) do extrato metanólico de pitaya (dragon fruit) em ratos, não obtiveram diferenças significativas para as avaliações hematológicas.

Tabela 2 - Efeitos do extrato *Jaracatiá spinosa* sobre parâmetros hematológicos de machos e fêmeas camundongos Swiss tratados 28 dias consecutivos

Hemograma Fêmeas		Dose (mg/kg/day)			
	Controle	1250	2500	5000	p-valor
Leucócitos ($\times 10^3$ cells/mm ³)	1.60 ^a \pm 0.85	1,16 ^a \pm 0.46	1.72 ^a \pm 0.91	2.34 ^a \pm 1.08	0.1483
Eritrócitos ($\times 10^6$ cells/mm ³)	9.06 ^a \pm 1.72	9,55 ^a \pm 1.25	10.22 ^a \pm 1.10	10.49 ^a \pm 1.12	0.4417
Hemoglobina (g/dl)	13.60 ^a \pm 2.03	14,64 ^a \pm 1.21	15,28 ^a \pm 1.92	15,46 ^a \pm 1.94	0.1311
Hematócrito (%)	43.91 ^a \pm 9.31	46,64 ^a \pm 7.61	48,12 ^a \pm 5.22	50,26 ^a \pm 4.29	0.1497
Linfócitos (%)	84.43 ^a \pm 9.13	88.50 ^a \pm 1.73	85.33 ^a \pm 9.07	82.57 ^a \pm 8.08	0.6029
Segmentados (%)	9.2 ^a \pm 2.78	15.80 ^a \pm 6.09	29.50 ^b \pm 8.65	20.50 ^b \pm 4.79	0.0056
Hemograma Machos		Dose (mg/kg/day)			
	Controle	1250	2500	5000	p-valor
Leucócitos ($\times 10^3$ cells/mm ³)	1.05 ^a \pm 0.19	1.20 ^a \pm 0.26	2.45 ^a \pm 1.91	1.20 ^a \pm 0.28	0.1722
Eritrócitos ($\times 10^6$ cells/mm ³)	6.44 ^a \pm 1.50	8.14 ^a \pm 2.30	8.29 ^a \pm 3.24	9.37 ^a \pm 0,40	0.2032
Hemoglobina (g/dl)	11.60 ^a \pm 0.75	12.32 ^a \pm 2.11	11.60 ^a \pm 5.51	13.85 ^a \pm 0.50	0.5200
Hematócrito (%)	32.50 ^a \pm 3.24	35.36 ^a \pm 9.50	36.70 ^a \pm 14.17	41.50 ^a \pm 1.75	0.4120
Linfócitos (%)	95.00 ^a \pm 5.15	85.80 ^a \pm 4.87	85.75 ^a \pm 7.45	82.50 ^a \pm 7.59	0.0530
Segmentados (%)	5.00 ^a \pm 1.15	11.60 ^a \pm 6.27	14.00 ^b \pm 6.98	17.25 ^b \pm 7.50	0.0026

Valores representados em média \pm desvio padrão.

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). ANOVA one way (Teste Tukey)

8.3.3.5 Avaliações bioquímicas

Em relação às análises bioquímicas (Tabela 3), observou-se significativo aumento de ALT ($p= 0,0048$) em machos do grupo 2500 e 5000, quando comparados ao grupo controle. Os achados corroboram com Almança et al. (2011) que observaram aumento significativo em atividades de ALT e AST em ratos que receberam doses mais baixas (0,1g/kg) à doses mais elevadas (1,4g/kg) do extrato hidroalcolico de *Solanum cernuu*.

A fosfatase alcalina estatisticamente apresentou alteração ($p<0.0001$) em machos dos grupos 1250, 2500 e 5000, sendo que o aumento ainda maior ocorreu no grupo 5000. Em fêmeas a elevação dos níveis séricos de fosfatase alcalina nos grupos 2500 e 5000 foram significativas ($p<0.0001$) em relação ao grupo controle, mas não diferiram na avaliação intragrupo.

Tabela 3

Efeito do extrato de *Jaracatia spinosa* sobre parâmetros bioquímicos em camundongos Swiss fêmeas e machos tratados por 28 dias

Parâmetros	Fêmeas (n=5)					Machos (n=5)				
	Controle	1250	2500	5000	p-valor	Controle	1250	2500	5000	p-valor
ALT (U/L)	42.40 ^a ± 20.12	39.60 ^a ± 11.84	38.20 ^a ± 21.51	47.50 ^a ± 20.99	0.8510	16.20 ^a ± 4.44	16.20 ^a ± 1.92	26.00 ^b ± 5.96	29.00 ^b ± 2.16	0.0048
AST (U/L)	102.20 ^a ± 39.30	94.40 ^a ± 19.44	108.60 ^a ± 49.66	92.33 ^a ± 10,54	0.4867	63.40 ^a ± 13.65	48.00 ^a ± 4.00	64.80 ^a ± 19.50	44.75 ^a ± 6.24	0.0618
Uréia (mg/dl)	42.40 ^a ± 7.50	43.20 ^a ± 11.97	36.40 ^a ± 4,83	48.67 ^a ± 9,48	0.1775	49.40 ^a ± 9.42	46.20 ^a ± 6.14	51.80 ^a ± 6.14	43.50 ^a ± 6.61	0.3659
Creatinina (mg/dl)	0.43 ^a ± 0.15	0.36 ^a ± 0.17	0.43 ^a ± 0,11	0.36 ^a ± 0,10	0.7013	0.40 ^a ± 0.12	0.37 ^a ± 0.02	0.40 ^a ± 0.09	0.31 ^a ± 0.04	0.3715
Glicose (mg/dl)	107.60 ^a ± 10. 74	145.80 ^a ± 39.21	152.00 ^a ± 46,23	122.17 ^a ± 38,87	0.2038	124.0 ^a ± 22.06	118.20 ^a ± 28.99	109.20 ^a ± 27.37	130.25 ^a ± 31.08	0.6940
Ácido úrico (mg/dl)	3.89 ^a ± 0.43	3.91 ^a ± 0.57	4.44 ^a ± 0,41	3.81 ^a ± 0,62	0.3606	1.74 ^a ± 0.31	1.72 ^a ± 0.41	1.98 ^a ± 0.40	2.20 ^a ± 0.28	0.2000
Colesterol (mg/dl)	115.60 ^a ± 4.88	121.2 ^a ± 12.79	131.40 ^a ± 7,89	127.83 ^a ± 8,61	0.3134	123.0 ^a ± 2.25	142.2 ^b ± 16.99	147.20 ^a ± 12.34	146,0 ^a ± 12.54	0.0529
Fosfatase alcalina (U/L)	93.20 ^a ± 14.51	120.40 ^a ± 42.90	173.40 ^b ± 36,53	197.33 ^b ± 21,12	<0.0001 1	89.40 ^a ± 4.48	126.60 ^b ± 24.39	150.6 ^b ± 10.43	167.50 ^c ± 12.69	<0.0001

Valores representados em média e ± desvio padrão.

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente-ANOVA one way e tukey test.

Silva et al. (2015) Em ensaio subcrônico com extrato hidroalcoólico da própolis vermelha nas doses de 100 e 200 mg/kg, Silva et al. (2015), observaram alteração nos índices de fosfatase alcalina em ratos.

Em relação ao aspartato aminotransferase, uréia, creatinina, ácido úrico, glicose e colesterol total, não foram encontradas significativas, em nenhuma das dosagens de extrato administradas.

8.3.3.6 Avaliações histológicas

Na tabela 4, estão apresentadas as alterações histológicas nos órgãos de machos e fêmeas nos diferentes tratamentos. Os resultados demonstram que o extrato de jaracatiá promoveu maiores alterações histológicas no estômago, fígado e baço dos animais.

No estômago (Tabela 4), em ambos os gêneros, as alterações na mucosa gástrica (Figura 4B), dos animais que receberam EJ foram mais frequentes em relação ao grupo controle. Adicionalmente alguns animais nos grupos 1250 e 2500 apresentaram alteração na cárdia, ainda, em animais do grupo 5000 foi observada infiltração leucocitária em machos e congestão em fêmeas.

Em estudo, vinculado ao Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos, observou-se que o extrato bruto da folha de *Aloe vera* não purificado consumido por ratos e camundongos durante 13 semanas (0%, 1%, 2% ou 3%) e 2 anos (0%, 0,5%, 1%, ou 1,5%) em água potável resultou em um aumento da incidência e severidade de hiperplasia no estômago e nas células caliciformes no intestino grosso de animais de ambos os gêneros (Boudreau et al., 2012). Esses resultados são consistentes com outros estudos envolvendo preparações de aloe vera não purificado, no qual foram encontradas quantidades elevadas de antraquinona (Matsuda et al., 2008 ; Yokohira et al., 2009). Há amplas evidências, na literatura, que sugerem efeitos carcinogênicos relacionados às antraquinonas (Gorkom e Vries, 2001; Programa Nacional de Toxicologia, 2005; Boudreau e Beland, 2006), tendo o FDA proibido o uso de medicamentos contendo esta substância não purificada.

Tabela 4

Alterações histológicas em órgãos de camundongos *swiss* machos e fêmeas, tratados por 28 dias consecutivos com extrato de *jaracatia spinosa*

Estômago	Grupo Controle		Grupo 1250		Grupo 2500		Grupo 5000	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
Congestão Vascular	-	-	-	-	-	-	1+ 40%	
Infiltração leucocitária	-	-	-	-	-	-	-	1+ 20%
Mucosa Gástrica Afetada	20%	20%	80%	80%	80%	80%	80%	60%
Cárdia Afetada	-	-	20%	-	-	20%	-	-
Fígado								
Congestão Vascular	1+ 20% 2+ 20%	1+ 40%	1+ 80%	1+ 80%	1+ 40%	1+ 100%	1+ 80%	1+ 60% 2+ 20%
Hepatócitos Vacuolizados	1+ 20%	-	1+ 80%		1+ 80%	1+ 20%	1+ 80%	1+ 20%
Hepatócitos Mal Definidos	-	-	80%	20%	80%	20%	20%	-
Sinusóides Mal Definidos	-	-	-	20%	-	-	-	20%
Hipocromia Subcapsular	-	-	20%	20%	100%	40%	60%	20%
Intestino jejuno								
GALT bem desenvolvido	-	-	-	-	-	-	20%	-
Baço								
Congestão Vascular	1+ 20%	1+ 20%	1+ 40% 2+ 60%	1+ 20%	1+ 80%	1+ 20%	1+ 40%	1+ 20%
Aumento de Megacariócitos	-	-	1+ 40% 2+ 20%	1+ 40% 2+ 20%	1+ 80%	1+ 80%	2+ 80%	1+ 20%
Polpa Branca Desorganizada			40%	40%		20%		
Aumento da Polpa Vermelha	-	-	40%	-	-	-	-	-
Polpa Branca Hiper celularizada	-	-	-	-	60%	-	100%	-
Pulmão								
Congestão Vascular	1+ 20%	-	1+ 80%	1+ 20%	1+ 60%	1+ 80%	1+ 80%	1+ 20% 2+ 20%
Infiltração leucocitária	1+ 40%	-	1+ 80%	1+ 40%	1+ 40%	1+ 60% 2+ 20%	1+ 40% 2+ 60%	1+ 40%
Espessamento Alveolar	20%	20%	80%	80%	80%	80%	100%	60%
Granulomas	-	-	-	20%	-	-	20%	-
Secreção Bronquiolar	-	-	-	-	-	20%	-	-
Rim								
Congestão Vascular	1+ 20%	-	1+ 100%	1+ 60%	1+ 60%	1+ 80%	1+ 100%	1+ 40%
Infiltração leucocitária	-	-	1+ 20%	1+ 20%	-	-	-	-
Túbulo com Acidofilia Aumentada	-	-	-	-	-	-	80%	-

Escore: - Ausente; 1+ Discreto; 2+ Moderado; 3+ Intenso

No fígado (Figura 4D) foi observado aumento na incidência de congestão vascular e hepatócitos vacuolizados e mal definidos em todos os grupos que receberam extratos, como também sinusóides mal definidos no grupo 1250 e 5000 de machos. A isquemia subcapsular hepática, caracterizada visualmente por hipocromia, ocorreu em todos os grupos tratados em ambos os gêneros, sendo destacada a frequência em fêmeas do grupo 2500 e 5000 (Tabela 4). Ensaio prévio com uso de *Senna occidentalis* a 4% (planta lactescente) durante 28 dias demonstrou hipocromia hepática em ratos tratados (Barbosa-Ferreira et al., 2005). Holstege (2005) demonstrou que em plantas do gênero *Solanum* a inibição das enzimas hepáticas microssomiais causa hemólise em exposições aguda ou por curto prazo. As antraquinonas têm demonstrado serem hepatoprotetoras em baixas dosagens (doses terapêuticas), porém demonstram efeitos hepatotóxicos com a utilização de doses progressivas (Wang et al., 2011). Portanto, diante dos achados histológicos deste estudo e da presença do látex no jaracatiá, hipotetizamos que os efeitos observados devem-se em parte à presença desses compostos.

As análises histológicas do baço (Figura 4F), em machos e fêmeas do grupo controle demonstraram congestão vascular discreta em 20% para cada gênero, com preservação da polpa branca e celularidade normal na polpa vermelha. Em todos os grupos tratados, a frequência de congestão vascular foi maior em fêmeas e similares ao grupo controle em machos. Nos grupos tratados houve observação adicional de aumentos do número de megacariócitos, sendo destacada nos grupos 2500 e 5000. No grupo 1250 foi evidenciada polpa branca desorganizada em ambos os gêneros. E, aumento da polpa vermelha em fêmeas desse grupo. A hipercelularização da polpa branca também foi observada em fêmeas dos grupos 2500 e 5000 (Tabela 4).

A presença de megariócitos no baço pode estar relacionada aos mecanismos de compensação após trombocitopenia (Machlus e Italiano, 2013). Em nossos achados observamos um quadro de trombocitose (Tabela 2), e hipotetizamos que seja reativa, secundária à trombocitopenia. Ainda, em baço da mesma forma Barbosa-Ferreira et al (2005) verificaram redução da polpa branca de ratos adultos, tratados com baixas concentrações de sementes de *Senna occidentalis* (até 1%), planta lactescente, concluindo toxicidade.

Em conclusão efeitos tóxicos não foram observados em ensaio agudo. Porém ensaios subcrônico de 28 dias demonstram aumento na contagem de plaquetas,

segmentados e no peso relativo do estômago, estes resultados em conjunto com achados histológicos indicam alterações relevantes.

Não sendo as dosagens deste experimento e frequência de consumo a realidade das comunidades, recomenda-se estudos mais aprofundados dos efeitos com baixas dosagens em uso crônico.

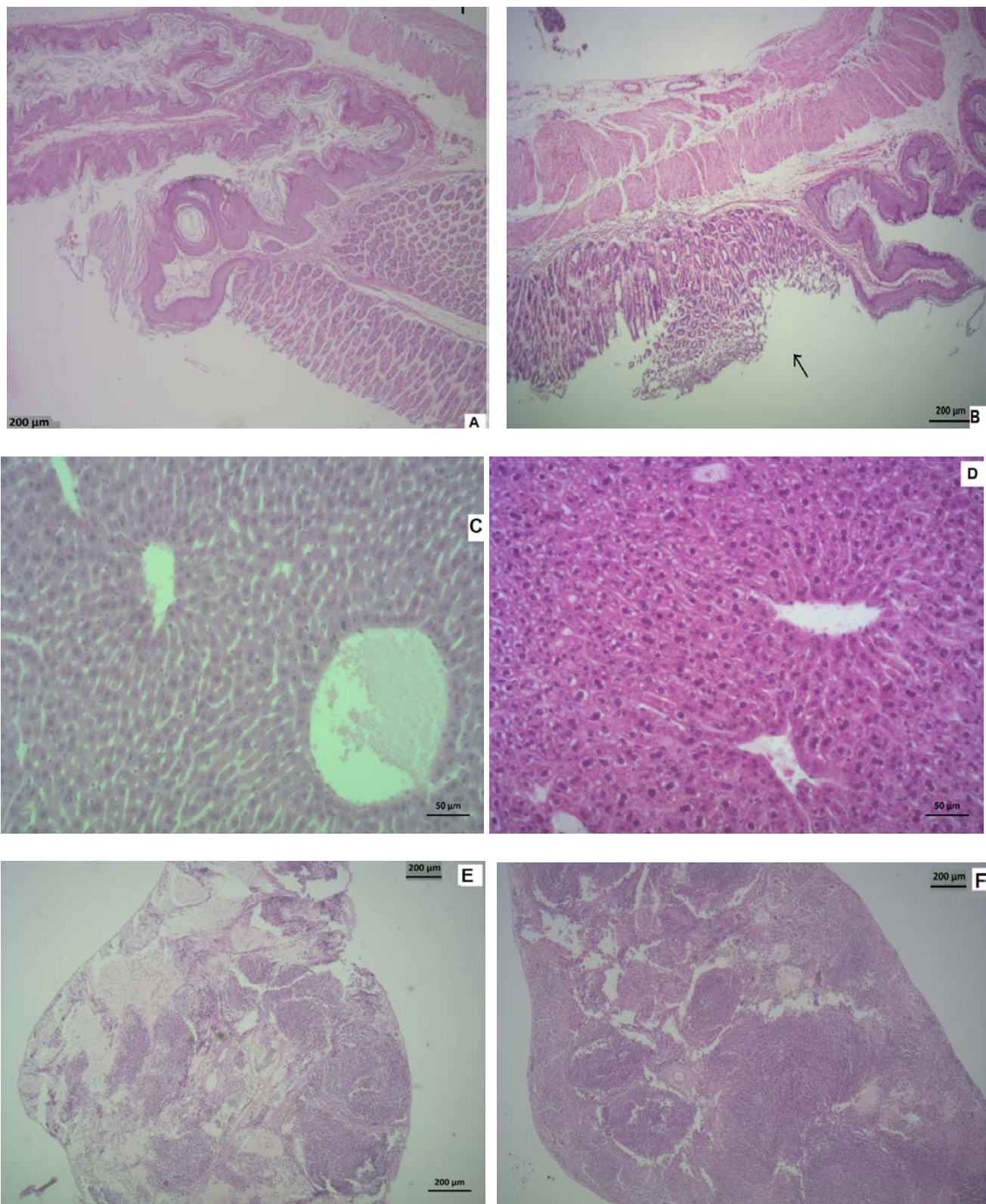


Fig4 Fotomicrografias do ensaio subcrônico com camundongos *Swiss*: estômago grupo controle (A) e estômago grupo tratado(B) fígado grupo controle(C) e fígado grupo tratado(D) baço grupo controle(E) e baço grupo tratado(F), com 5000 mg/kg/dia de extrato de *Jaracatiá spinosa*.

8.4 Referências

- Abreu, H., 2015. Estudo nutricional, fitoquímico e biológico do “jaracatiá” (*Jacaratia spinosa* (Aubl) A. DC). Dissertação (mestrado) :Curitiba
- Aguiar, F. L.; Almeida, C. A.; Camargos, L. S. A Caracterização Bioquímica Da Composição Do Cerne De Jaracatiá (*Jacaratia spinosa*). Acta Iguazú. Cascavel, v.1, n.4, p. 65 - 71, 2012
- Almança, C.C.J., Saldanha, S.V., Sousa, D.R., Trivilin, L.O., Nunes, L.C., Porfírio, L.C., Marinho, B.G., 2011. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. J. Ethnopharmacol. 138, 508–512. doi:10.1016/j.jep.2011.09.045
- Association of official analytical chemistry (A.O.A.C), 2005. Methods of analysis of the association of official analytical chemists, 13 Ed. Arlington.
- Badillo, V.M. Monografía de la familia Caricaceae. Asociación de profesores, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay. 1971.
- Barbosa-Ferreira, M., Dagli, M.L.Z., Maiorka, P.C., Górniak, S.L., 2005. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. Food Chem. Toxicol. 43, 497–503. doi:10.1016/j.fct.2004.11.017
- Bleeker, J.S., Hogan, W.J., Bleeker, J.S., Hogan, W.J., 2011. Thrombocytosis: Diagnostic Evaluation, Thrombotic Risk Stratification, and Risk-Based Management Strategies. Thromb. 2011, e536062. doi:10.1155/2011/536062
- Boudreau, M.D., Beland, F.A., Nichols, J.A., Pogribna, M., 2013. Toxicology and carcinogenesis studies of a nondecolorized [corrected] whole leaf extract of *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water study). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 1–266.
- Brasil. Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2008.
- Corrêa, P. M.; Pena, L. de A., 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro.
- Damy, S.B., Camargo, R.S., Chammas, R., Figueiredo, L.F.P. de, 2010. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. Rev. Assoc. Médica Bras. 56, 103–111. doi:10.1590/S0104-42302010000100024
- Dharmarathna, S.L.C.A., Wickramasinghe, S., Waduge, R.N., Rajapakse, R.P.V.J., Kularatne, S.A.M., 2013. Does *Carica papaya* leaf-extract increase the platelet count? An experimental study in a murine model. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3, 720–724. doi:10.1016/S2221-1691(13)60145-8.
- Food and Drug Administration- FDA. 2007. Toxicological Principles for the safety assessment of food Ingredients. e-book, Available: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/Redbook/default.htm> accessed on: 25.06.2015
- Hoehne, F. C., 1946. Frutas Indígenas. Instituto de Botânica; Publicação da série “D”, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio. São Paulo.
- Holstege, C.P. “Solanum genus.” In Wexler P (ed): Encyclopedia of Toxicology. 2nd Edition. Elsevier Ltd, Oxford, UK. 2005;4:66.
- Hor, S.Y., Ahmad, M., Farsi, E., Yam, M.F., Hashim, M.A., Lim, C.P., Sadikun, A., Asmawi, M.Z., 2012. Safety assessment of methanol extract of red dragon

- fruit (*Hylocereus polyrhizus*): acute and subchronic toxicity studies. Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP 63, 106–114. doi:10.1016/j.yrtph.2012.03
- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). 2004. Mapa de Biomas do Brasil e de Vegetação. Brasília.
- Khoo, Z.Y., Teh, C.C., Rao, N.K., Chin, J.H., 2010. Evaluation of the toxic effect of star fruit on serum biochemical parameters in rats. Pharmacogn Mag 6, 120–124. doi:10.4103/0973-1296.62899
- Kinupp, V. F; Lorenzi, H. 2014. Plantas Alimentícias não-convencionais no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. Ed. Plantarum. Nova Odessa-Sp.
- ¹Luyong ,Z., Zhenzhou ,J., Cunhai , P.; Ming,Y. 2004. Six-month oral toxicity study of total anthraquinone in radix et rhizoma rhei in SD rats. Europe PMC, 25 (4):206-209
- Malone, m. H; Robichaud, r. C. The pharmacological evaluation of natural products general and pecificapproaches to screening ethnopharmaceuticals. J Ethnopharmacol, v. 8, p. 127-147, 1983.
- Martinez- Crovetto, R. La alimentación entre los indios guaranies de Misiones (Republica Argentina). Etnobiologia. Corrientes,n.4,p.1-24, 1968.
http://ibone.unne.edu.ar/objetos/uploads/documentos/bonplandia/public/6_2/83_91.pdf
- Matsuda, Y., Yokohira, M., Suzuki, S., Hosokawa, K., Yamakawa, K., Zeng, Y., Ninomiya, F., Saoo, K., Kuno, T., and Imaida, K. (2008). One-year chronic toxicity study of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger in Wistar Hannover rats. A pilot study. *Food Chem. Toxicol.* 46, 733-739.
- ²Montrucchio,D.P. 2012. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcalóide S-(+)-dicentrina extraído de frutos de *Ocotea puberula* (Lauraceae). Tese (Doutorado em farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- Organisation for Economic Cooperation and Development.2001. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris.
- Organisation for Economic Cooperation and Development. 2008. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents,Paris.
- Próspero, E. T. P. 2010. Caracterização da fruta Jacaratiá spinosa e processamento do doce de jaracatiá em calda com avaliação da estabilidade. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Restell, T.I., Porfirio, L.C., Souza, A.S. de, Silva, I.S., 2014. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. Acta Cirúrgica Bras. Soc. Bras. Para Desenvolv. Pesqui. Em Cir. 29, 306–312.
- Rose, S.R., Petersen, N.J., Gardner, T.J., Hamill, R.J., Trautner, B.W., 2012. Etiology of thrombocytosis in a general medicine population: analysis of 801 cases with emphasis on infectious causes. J. Clin. Med. Res. 4, 415–423. doi:10.4021/jocmr1125w
- Silva, R. O.; Andrade VM, Bullé Rêgo ES., 2015. Avaliação da Toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 170, 2015. p. 66 -71
- Souza, G.S. 1938. Tratado descritivo do Brasil em 1587. 3 ed. Companhia editora Nacional e Editora da USP. São Paulo.

- Thrall, M.A. 2015. Veterinary Hematology and Biochemistry . 2 Ed. Roca, São Paulo. Tropicos.org. *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC. Jardim Botânico de Missouri. Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 8063110. 2013. Available: <<http://www.tropicos.org/Name/6100046>>. Accessed on: 02.02.2015.
- UNECE – United Nations Economic Commission for Europe. 2011. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). <http://www.Unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-A C10-3 0- Rev4e.pdf> (accessed 08.09.15.).
- Voss, K.A., Brennecke, L.H., 1991. Toxicological and hematological effects of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) seeds in Sprague-Dawley rats: a subchronic feeding study. *Toxicon* 29, 1329–1336.
- Wang, J., Zhao, H., Zhao, Y., Jin, C., Liu, D., Kong, W., Fang, F., Zhang, L., Wang, H., Xiao, X., 2011. Hepatotoxicity or Hepatoprotection? Pattern Recognition for the Paradoxical Effect of the Chinese Herb *Rheum palmatum* L. in Treating Rat Liver Injury. *PLOS ONE* 6, e24498. doi:10.1371/journal.pone.0024498
- World Health Organization. 2000. Guidelines for the preparation of toxicological working papers for the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – Geneva, 2000.

9 ARTIGO 2 : Avaliação da toxicidade do extrato de *Jaracatiá spinosa*, em frutos *in natura* e em calda, em camundongos.

Cellen Giacomelli Groth Luiz^a, Gabriela Moraes Fortuna^b, Railson Renneber^c, Rubens Bertazolli Filho^d, Deise Montrucchio^c, Elizabeth do Nascimento^e, Mônica de Caldas Rosa dos Anjos^f, Sila Mary Rodrigues Ferreira^a

a Universidade Federal do Paraná (UFPR). Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil

b Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curso de Graduação em Nutrição. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil

c Universidade Federal do Paraná (UFPR). Departamento de Farmácia.. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil

d Universidade Federal do Paraná (UFPR). Departamento de Biologia Celular. Centro Politécnico 81531-990. Curitiba, Paraná,, Brasil

e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Programa de Pós-graduação em Nutrição. Cidade Universitária. 50670-901 Recife, Pernambuco., Brasil

f Universidade Federal do Paraná (UFPR). Departamento de Nutrição. Campus III. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. 80.210-170. Curitiba, Paraná, Brasil

Resumo

O *Jaracatiá spinosa* é um fruto alimentício não convencional rico em látex. Indicativos de toxicidade foram apontados previamente em outro estudo. Algumas comunidades relatam a possibilidade de consumir os frutos cozidos em calda.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito tóxico dos animais tratados com extrato de *jaracatiá in natura* (EJIN) e extrato de *jaracatiá* em calda (EJC), na dosagem 5000 mg/kg/dia e avaliar em grupo satélite a reversibilidade de eventuais danos ocorridos. Para todos os modelos utilizaram-se os protocolos internacionais para ensaio subcrônico em camundongos.

Foram identificados sinais de piloereção, aumento no número de bolos fecais, aumento do peso relativo de estômago, alterações bioquímicas e hematológicas.

Apesar de algumas reversibilidades das alterações terem sido percebidas, como peso de estômago e número de megacariócitos. Adicionalmente em grupo satélite apresentou aumento no peso relativo do fígado, em conjunto com a elevação da glicose e do colesterol, achados que em conjunto representam alterações importantes em camundongos que utilizam o extrato do fruto *in natura* de forma subcrônica em doses elevadas. Conclui-se que na utilização do EJIN e EJC em ensaios subcrônico de 28 dias há alterações semelhantes e relevantes para ambos os produtos utilizados.

9.1 Introdução

O *Jacaratia spinosa*, pertencente à família *Caricaceae*, está distribuído em países da América do Sul (Trópicos, 2013).

O ensaio anterior (artigo 1) demonstrou alterações histológicas, hematológicas e bioquímicas, em camundongos Swiss submetidos ao uso do extrato do fruto *Jaracatiá spinosa in natura* (5000mg/kg/dia) durante 28 dias. Ainda, há relatos de que o abuso na ingestão de frutos *in natura* pode provocar desconforto abdominal e edema labial (Hoehne, 1946; Correia, 1984; Paula, 2009). Por outro lado, alguns autores referem que índios guaranis consomem os frutos apenas assados, e relatam também que algumas comunidades realizam incisões longitudinais a fim de drenar previamente o excesso de látex, e cozinham o fruto em calda (Martínez-Crovetto, 1968; Kinupp e Lorenzi, 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos em animais tratados com extrato de jaracatiá *in natura* (EJIN) e extrato de jaracatiá em calda (EJC), na dosagem 5000mg/kg/dia. Para o extrato de frutos de jaracatiá *in natura* foi utilizado adicionalmente um grupo satélite, a fim de avaliar reversibilidade de eventuais danos ocorridos. Para todos os modelos utilizaram-se os protocolos internacionais para ensaio subcrônico em camundongos (OECD, 2008).

9.2 Materiais e métodos

9.2.1 Frutos

Os frutos de *Jaracatiá spinosa* foram coletados em Rolândia /Paraná/ Brasil (S- 23°14'48" / W- 51°24'43") em fevereiro de 2015. A determinação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba/ Paraná/ Brasil, por meio da exsicata de nº. 379131 e acesso de remessa da amostra de patrimônio genético sob a autorização de nº. 010004/2015-7 no *National Counsel of Technological and Scientific Development*.

9.2.2.Preparação dos extratos

Frutos *in natura* e em calda no estágio maduro, com pelo menos 75% da casca de cor alaranjada, foram selecionados para caracterização química, em triplicata (AOAC, 2005).

Os frutos de *Jaracatiá spinosa* foram devidamente lavados e sanitizados (Silva Junior, 2005). Uma parte dos frutos foi utilizada para preparo de extrato de *jaracatiá* proveniente do fruto *in natura* (EJIN) e outra parte para elaboração do fruto em calda.

Os frutos *in natura* foram submetidos ao processo de retirada do pedúnculo, separação da casca, da polpa e das sementes. Posteriormente a polpa foi triturada em multiprocessador Arno®, congelada e liofilizada (- 20°C).

As soluções para administração do EJIN foram preparadas diariamente, diluindo o fruto *in natura*, liofilizado em água destilada e emulsificante *tween* 80 (5%).

Para preparo do fruto em calda a técnica consistiu em cortar o fruto ao meio, retirar as sementes e fazer incisões longitudinais no fruto com casca deixando-o de molho em água por 24 horas, a fim de drenar parcialmente o látex, como referido popularmente. Posteriormente os frutos foram lavados e cozidos em banho-maria dentro de vidros contendo calda com 40% de açúcar por 45 minutos (BRASIL, 2012). Os frutos foram resfriados (4°C) e triturados em multiprocessador Arno®, na sequência foram congelados (- 18°C). e liofilizados (- 20°C).

As soluções para administração do extrato de *jaracatiá* em calda (EJC) foram preparadas diariamente, diluindo o fruto em calda liofilizado, em água destilada e emulsificante *tween* 80 (5%).

As soluções foram administradas nas dosagem 5000 mg/kg tanto EJIN quanto para EJC.

9.2.3 Ensaio biológicos

Foram utilizados camundongos machos da espécie *Mus musculus* e linhagem *swiss*, com oito semanas de idade e pesos entre 25 e 35g . Os animais foram

agrupados em gaiolas de polipropileno opacas, forradas com maravalha, alocando cinco animais por gaiola. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura controlada a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a ração e água potável *ad libitum*. Os animais foram ambientados às condições do laboratório por sete dias antes do início do experimento (Damy et. al., 2010).

Foram avaliados os sinais comportamentais e fisiológicos (mudanças na pele, pêlos, olhos, mucosas, respiração, tônus muscular, atividade motora, convulsão, salivação, diarreia, letargia e temperatura corporal). Na avaliação da piloereção foram definidos quatro graus, sendo eles: ausência de sinais, raros sinais, sinais evidentes, sinais evidentes e contínuos (Malone & Robichaud, 1983). O peso dos animais e o consumo de água e de ração foram avaliados diariamente (OECD, 2001; 2008).

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA, da Universidade Federal do Paraná sob nº. 869. Todo o experimento ocorreu em conformidade com os princípios definidos pelas Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, obedecendo aos preceitos da legislação brasileira (Brasil, 2008).

9.2.3.1 Ensaio toxicológico subcrônico

O teste de toxicidade subcrônica consistiu em 28 dias, conforme metodologia do OECD 407 (OECD, 2008) utilizando 5 animais por grupo totalizando 20 animais.

Os animais foram divididos no seguintes grupos: grupo controle, animais que receberam apenas o veículo, grupo 5000 receberam EJIN por 28 dias. Grupo 500014D, denominado grupo satélite, animais que receberam EJIN por 28 dias, e permaneceram 14 dias sem uso do extrato a fim de avaliar a reversibilidade dos sinais. E, animais do grupo 5000CZ receberam EJC por 28 dias. Todos os animais foram avaliados diariamente conforme descrito no item 2.3.

No 29º dia (grupos 5000 e 5000CZ) e 43º dia (grupo 500014D) após terem sido submetidos ao jejum de 12 horas com permanência de água *ad libitum*, os animais foram encaminhado para a coleta 1,0 ml de sangue (acondicionado 0,2 ml em tubo com EDTA e 0,8 ml em tubo seco). Previamente os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg.). O sangue total foi utilizado para análise hematológica por

automação (Micros Horiba ABX®) de acordo com os procedimentos padrões. A leitura das lâminas hematológicas foi realizada utilizando microscópio ótico. Análises bioquímicas foram realizadas por automação (Labmax 400® da Labtest ®) em soro, após centrifugação do sangue coagulado a 3.500 rpm por 10 minutos. Foram analisadas as funções hepáticas (aspartato aminotransferase - AST, alanina aminotransferase - ALT, fosfatase alcalina), renais (uréia, creatinina, ácido úrico) e outros parâmetros bioquímicos (glicose e colesterol total) com kit específico Labtest®.

A eutanásia dos animais ocorreu por exsanguinação ou deslocamento cervical quando necessário. Em seguida, órgãos vitais (fígado, baço, rins e estômago) foram retirados, pesados e examinados macroscopicamente. O peso relativo do órgão foi calculado como base na equação: (órgão/peso corpo) x100.

Na sequência, os órgãos foram cortados e fixados em solução formalina (10%), desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e cortados em 5µm de espessura com micrótomo da marca Leica® Rm 2145. Posteriormente foram corados pelo método da hematoxilina de Harris, e fotografados em fotomicroscópio Zeiss (Axio LabA1), acoplado a câmera AxioCam ERc5s e, processados no programa ZEN Digital Imaging. Todas as análises microscópicas foram realizadas de forma cega em relação aos grupos. As amostras de tecidos foram avaliadas estruturalmente observando lesões, congestão ou hemorragia, necrose, fibrose, infiltração leucocitária, degeneração gordurosa e acúmulo de pigmentos biliares.

9.3 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prisma®. (*Graphpad Prism 5.0 software Inc* La Jolla, CA, USA). Para avaliação de peso dos órgãos, análises bioquímicas e hematológicas foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via *one way* seguida do teste *Tukey*. Para avaliação do ganho de peso foi utilizado ANOVA de duas vias *two way* seguido do teste de *Bonferroni*. Para fins estatísticos considerou-se um nível de significância de 5%. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão.

9.4 Resultados e discussão

9.4.1 Caracterização dos frutos

A caracterização do jaracatiá *in natura* e em calda pode ser visualizada na

Tabela 1

Composição química de frutos de *Jaracatiá spinosa in natura* e em calda.

Parameters	<i>In natura</i>	Em calda
Umidade (fruto fresco)	85,434 ± 0,643	77,231 ± 0,264
Cinzas (g/100g fresh matter)	0,911 ± 0,030	0,547 ± 0,011
Proteínas Totais (g/100 dry matter)	2,353 ± 0,056	0,8066 ± 0,032
Lipídeos (g/100 g dry matter)	0,173 ± 0,004	0,234 ± 0,0002
Carboidratos (g/100 g dry matter)	11,126 ± 0,649	19,196 ± 0,544
Fibras (g/100 g dry matter)	4,471 ± 0,021	2,532 ± 0,011

Valores expressos em média e desvio padrão

9.4.2 Ensaio Biológico

9.4.2.1 Sinais clínicos

Durante o tratamento nenhuma morte foi observada nos grupos. A diminuição na deambulação, o ato de limpar-se e sinais de contrações abdominais, evidenciando cólicas abdominais foram observados em 100% dos animais tratados. Em relação à evacuação, os animais tratados demonstraram aumento no número de bolos fecais em relação ao grupo controle, apresentaram fezes mais amolecidas e tamanho dos bolos fecais 30% maiores. O número de bolos fecais em relação ao grupo controle na dosagem 5000 aumentou 254,7%. No grupo 5000CZ esse aumento foi menor sendo 207,65% em machos. No grupo 500014 na primeira semana após a retirada do extrato o aumento no número de bolos fecais ainda foi 122%, sendo na segunda semana após a retirada do extrato ainda 40% maior que o grupo controle.

Postulamos que o aumento da frequência de fezes e alteração da consistência deve-se a composição química do fruto, sobretudo a presença do látex. Apesar de proporcionalmente o fruto utilizado para a elaboração do EJC oferecido ao grupo 5000C ter menor quantidade de fibra, postulamos ainda que os frutos deste extrato tiveram seu látex parcialmente drenado, sendo uma justificativa para menor quantidade de emissão de número de bolos fecais comparados ao grupo 5000.

Corroborando com achados de Holstege (2005), o qual evidencia em seus achados que plantas do gênero *Solanum*, as quais são lactescentes, quando em exposição crônica, podem produzir diarreia em humanos. Os mecanismos propostos são devido às antraquinonas, presentes no látex, as quais atuam no canal de cloro da membrana celular, bloqueando a absorção de eletrólitos na mucosa do intestino grosso e causando um aumento da pressão local e do peristaltismo intestinal. Almança et. al., (2011) da mesma forma, descreve diarreia em ratos que receberam 1,4g/kg do extrato hidroalcólico de *Solanum cernuum*, planta lactescente, em ensaio subcrônico.

Não houve alterações em relação à temperatura, sinais de cianose, lacrimações, hipnose e anestesia. Em relação à piloereção, no grupo controle a frequência de sinais raros de piloereção em fêmeas foi 17% e em machos 8%, demais animais não apresentaram sinais de piloereção, neste grupo. Nos grupos 5000 e 5000cz machos e fêmeas apresentaram sinais evidentes e contínuos de piloereção em 100% dos animais. No grupo 500014 observou-se que durante o uso do EJIN 100% dos animais apresentaram sinais evidentes e contínuos de piloereção, na primeira semana após a retirada do extrato os sinais persistiram na mesma proporção. Já na segunda semana de retirada do extrato a frequência para sinais evidentes e contínuos foi 60%, demais animais apresentaram sinais raros de piloereção. Esses resultados corroboram com estudo prévio que utilizou extrato hidroalcólico de *Solanum cernuum* nas dosagens 2,4, 8, 12, 16, 20 e 25g/kg em ratos, evidenciando sinais intensos de piloereção.(Almança et al, 2011)

9.4.2.2 Peso e avaliação macroscópica dos órgãos

A administração oral dos extratos promoveu aumentos significativos no peso do estômago nos grupos 5000 e 5000CZ ($p = 0,0001$) comparados ao grupo controle (Figura 1). No grupo 500014 não houve diferença estatística para peso de estômago em relação ao grupo controle, indicando a reversão do tamanho do órgão após a retirada do EJIN.

Apesar da reversão no tamanho ainda observou-se hiperemia no órgão em 60% dos animais, o que sugere injúria química (Odze e Goldblum, 2009).

Em estudo, vinculado ao Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos, observou-se que o extrato bruto da folha de *Aloe vera* não purificado

consumido por ratos e camundongos durante 13 semanas (0%, 1%, 2% ou 3%) e 2 anos (0%, 0,5%, 1%, ou 1,5%) em água potável resultou em um aumento da incidência e severidade de hiperplasia no estômago em animais de ambos os gêneros (Boudreau et al., 2012). Esses resultados corroboram com outros estudos envolvendo preparações de Aloe vera não purificado, no qual foram encontradas quantidades elevadas de antraquinona, provenientes do látex (Matsuda et al., 2008 ; Yokohira et al., 2009). Atualmente, nos Estados Unidos o *FDA (Food and Drug Administration)* proibiu uso de medicamentos contendo Aloe vera não purificada.

Ainda, há na literatura, apontamentos que sugerem efeitos carcinogênicos relacionados às antraquinonas (Gorkom e Vries, 2001; Programa Nacional de Toxicologia, 2005; Boudreau e Beland, 2006).

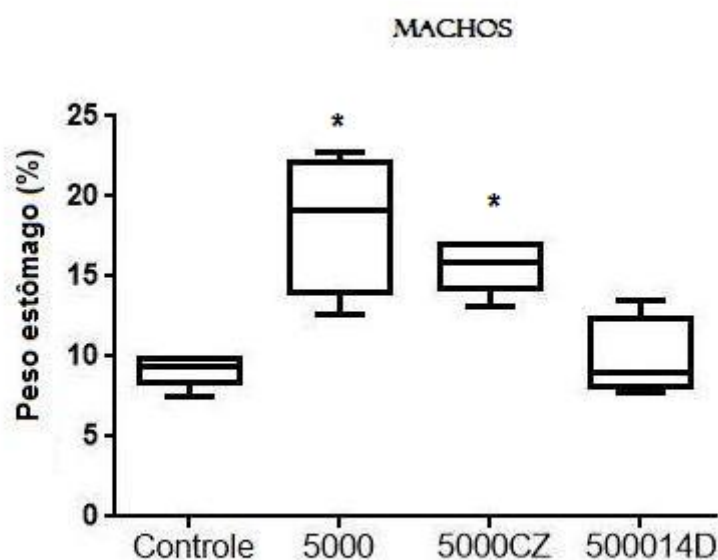


Figura 1 - Peso relativo do estômago (peso estômago/peso corporal %) machos, grupos controle e grupos tratados com extrato de Jaracatiá spinosa por 28 dias. Dados apresentados em média e desvio padrão da média. * $p < vs$ controle ANOVA one way (teste tukey).

Em relação ao peso do fígado (Tabela 1) nos animais 500014 houve aumento do peso do órgão em relação ao grupo controle ($p = 0,0008$). Juber et al. (2006) refere que após episódios de agressão do órgão, ocorre restauração da massa hepática por hiperplasia celular compensatória, com consequente aumento em suas dimensões e sendo evidenciadas com o aumento do peso.

Luyong et al (2004) relataram aumento de peso em rins por infiltrado inflamatório em animais que consumiram antraquinonas proveniente de ruibarbo. Estudo prévio avaliando a toxicidade do *Aloe vera*, ao contrário, evidenciou diminuição da massa renal em fêmeas que receberam a dosagem de 4% durante um ano de uso. As diferenças foram atribuídas ao grau de hidratação dos animais, visto que causa efeitos laxativos (Matsuda et al., 2008).

Para os demais órgãos estudados, nenhuma alteração no peso foi observada.

Tabela 1

Efeitos do uso oral do extrato de *Jaracatia spinosa* no peso relativo dos órgãos (peso órgão/peso corporal%) em machos de camundongos *Swiss* tratados por 28 dias consecutivos, e grupo satélite.

Órgãos	Machos				
	Controle	5000	5000CZ	500014D	p-valor
Fígado	41,57 ^a ± 2,72	38,72 ^a ± 1,35	38,15 ^a ± 2,29	45,62 ^b ± 3,15	0,0008
Baço	2,99 ^a ± 0,37	3,17 ^a ± 0,49	2,85 ^a ± 0,44	2,40 ^a ± 0,39	0,0749
Rins	14,34 ^a ± 1,02	13,59 ^a ± 0,17	12,82 ^a ± 1,02	13,40 ^a ± 0,71	0,4467

Valores representados em média e ± desvio padrão. ANOVA one way (teste Tukey). Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

9.4.2.3 Avaliações hematológicas

As análises estatísticas para padrões hematológicos demonstraram diferenças significativas apontado as elevações das plaquetas (Tabela. 2) ($p < 0.0001$) nos grupos 5000, 5000CZ comparados ao grupo controle. A reversibilidade não foi observada em animais do grupo 500014D comparados ao grupo controle. Sendo as plaquetas células inflamatórias com importante papel na defesa do organismo, desordens plaquetárias, podem ocorrer primariamente em resposta à hemorragia aguda ou ainda trombocitose reativa, secundária à inflamação. Ainda, doenças crônicas, desordens no trato digestório ou endócrinas, bem como danos teciduais podem ser causas de trombocitose (Bleeker e Hogan, 2011; Rose et. al., 2012).

Voss e Brennecke (1991) observaram trombocitose em ensaio subcrônico com ratos tratados com *Cassia obtusifolia* (0,50%) por mais de 30 dias e atribuiu a toxicidade à antraquinona presente no látex.

Um ensaio subcrônico realizado com extrato bruto de folhas de *Carica papaya* aumentou significativamente a contagem plaquetária do grupo tratado ($1133 \pm 0,35 \times 10^3 / \text{mm}^3$) em relação ao grupo controle ($553 \pm 0,12 \times 10^3 / \text{mm}^3$) após o 3º dia de tratamento (Dharmarathna et al, 2013).

No grupo de fêmeas 5000 observou-se a elevação dos eritrócitos em relação ao grupo controle ($p: 0,0417$), o mesmo não foi observado em machos.

Tabela 2- Efeitos do extrato *Jaracatiá spinosa* sobre parâmetros hematológicos de machos de camundongos Swiss tratados 28 dias consecutivos e grupo satélite

Hemograma	Male (n=5)	Dose (mg/kg/day)			
	Controle	5000	5000CZ	500014D	p-value
Leucócitos ($\times 10^3 \text{ cells/mm}^3$)	$1.05^a \pm 0.19$	$1.20^a \pm 0.28$	$1.50^a \pm 0.35$	$1.08^a \pm 0.67$	0.4683
Eritrócitos ($\times 10^6 \text{ cells/mm}^3$)	$6.44^a \pm 1.50$	$9.37^a \pm 0.40$	$9.04^a \pm 1.25$	$9.33^a \pm 0.47$	0.0025
Hemoglobina (g/dl)	$11.60^a \pm 0.75$	$13.85^a \pm 0.50$	$13.10^a \pm 1.74$	$13.88^a \pm 0.93$	0.0295
Hematócrito (%)	$32.50^a \pm 3.24$	$41.50^a \pm 1.75$	$40.30^a \pm 5.66$	$41.16^a \pm 3.01$	0.0108
Plaquetas ($\times 10^3 \text{ cells/mm}^3$)	$445.25^a \pm 58.02$	$879.50^b \pm 36.05$	$797.50^b \pm 83.91$	$927.60^b \pm 145.39$	<0.0001
Linfócitos (%)	$95.00^a \pm 1.15$	$82.50^a \pm 7.59$	$85.25^a \pm 3.59$	$88.20^a \pm 1.92$	0.0063
Segmentados (%)	$5.00^a \pm 1.15$	$17.25^b \pm 4.50$	$14.00^b \pm 2.71$	$11.20^b \pm 1.92$	0.0048

Valores representados em média e \pm desvio padrão.

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente-ANOVA one way e tukey test.

9.4.2.4 Avaliações bioquímicas

Em relação às análises bioquímicas (Tabela 3), observou-se aumento significativo de ALT em animais do grupo 5000, quando comparados ao grupo controle. O grupo 500014 não demonstrou alterações significativas em relação ao grupo controle. Ressaltamos que a meia vida da enzima ALT é de até dois dias, o que poderia ter normalizado os valores após 14 dias sem a ingestão do EJIN (Thrall, 2015). Almança et al (2011) descrevem aumento significativo em atividades de AST e ALT em relação ao grupo controle em ratos que receberam doses mais baixas (0,1g/kg) à doses mais elevadas (1,4g/kg) do extrato hidroalcolico de *Solanum cernuu*, planta lactescente. Assim concluindo-se que estas diferenças estatísticas são biologicamente relevantes ainda que estejam dentro dos parâmetros de referência.

A fosfatase alcalina elevou significativamente em machos ($p < 0.0001$) dos grupos 5000 e 5000cz em relação ao grupo controle. No grupo 500014 dias não há alteração significativa, demonstrando novamente normalização de enzimas que possuem meia vida curta (Thrall, 2015).

Silva et al. (2015) em ensaio subcrônico com extrato hidroalcolico da própolis vermelha nas doses de 100 e 200 mg/kg, observaram alteração nos índices de fosfatase alcalina em ratos. Para o extrato bruto de jaracatiá spinosa não foram encontradas alterações significativas em aspartato aminotransferase, uréia, creatinina, ácido úrico, glicose e colesterol total, nos animais dos grupos 5000 e 5000CZ. No entanto, no grupo 500014D houve alteração em colesterol total ($p = 0.0008$) e glicose ($p < 0.0001$). Sendo o fígado o principal órgão responsável pela síntese de colesterol, esses dados corroboram com a hipertrofia do órgão (Linsel-Nitschke et al, 2005).

A hiperglicemia de estresse tem como causa a elevação nos níveis de cortisol, epinefrina e glucagon, ocasionados por doenças ou traumas agudos em resposta ao estresse metabólico. A elevação destes compostos promovem a inibição e a ação da insulina, aumentando a neoglicogênese, causando inibição na síntese de glicogênio e dificultando a captação da glicose mediada pela insulina em tecidos periféricos (Marik and Bellomo, 2013).

Tabela 3

Efeito do extrato de *Jaracatia spinosa* sobre parâmetros bioquímicos em camundongos Swiss machos tratados por 28 dias

Parâmetros	Controle	5000	5000cz	500014	p-valor
ALT (U/L)	16.20 ^a ± 4.44	29.00 ^b ± 2.16	19.20 ^a ± 4.44	22.00 ^a ± 1.22	0.0047
AST (U/L)	63.40 ^a ± 13.65	44.75 ^a ± 6.24	58.00 ^a ± 20.99	57.80 ^a ± 14.62	0.3562
Ureia (mg/dl)	49.40 ^a ± 9.42	43.50 ^a ± 6.61	52.80 ^a ± 11.45	71.60 ^a ± 13.28	0.0064
Creatinina (mg/dl)	0.40 ^a ± 0.12	0.31 ^a ± 0.04	0.41 ^a ± 0.10	0.38 ^a ± 0.01	0.3385
Glicose (mg/dl)	124.0 ^a ± 22.06	130.25 ^a ± 31.08	150.60 ^{ac} ± 17.76	235.20 ^{bc} ± 29.73	<0.0001
Ácido úrico (mg/dl)	1.74 ^a ± 0.31	2.20 ^a ± 0.28	1.86 ^a ± 0.30	1.96 ^a ± 0.47	0.2961
Colesterol (mg/dl)	123.0 ^a ± 22.25	149.8 ^a ± 12.54	154 ^a ± 13.27	163.6 ^b ± 7.47	0.0008
Fosfatase alcalina (U/L)	89.40 ^a ± 14.48	167.50 ^b ± 12.69	152.00 ^b ± 11.07	89.80 ^a ± 13.03	<0.0001

Valores representados em média e ± desvio padrão.

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente-ANOVA one way e tukey test.

9.4.2.5 Avaliações histológicas

No estômago (tabela 4), foram observadas alterações histológicas (Figura 2B) na mucosa gástrica dos grupos tratados superiores ao grupo controle. Nos grupos 5000CZ e 500014D a frequência da mucosa gástrica afetada foi menor em relação ao grupo 5000, porém ocorreu adicionalmente alteração na cárdia em 40% do animais no grupo 5000CZ e 40% do grupo 500014D.

Hipotetizamos a frequência menor em relação à dose resposta ao látex, visto que o extrato utilizado no grupo 5000CZ teve o látex de seus frutos parcialmente drenados.

Os animais do grupo 500014D aparentemente tiveram uma redução na frequência de injúria após a retirada do EJIN, sugerindo que as agressões na mucosa gástrica quando usado o extrato por 28 dias pode ser reversível em alguns animais (Odze e Goldblum, 2009).

Em estudo realizado por Boudreau et al., 2013, verificou-se destacada hiperplasia de estômago em camundongos que consumiram Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) não purificado, ou seja, extrato bruto rico em látex, por dois anos na água.

Na avaliação hepática histológica (Figura 2 D), foi observada congestão vascular superior ao grupo controle (tabela 5), em todos os grupos tratados, hepatócitos vacuolizados também foram mais frequentes em animais do grupo 5000 e 5000CZ. Houve observação adicional de hepatócitos e sinusóides mal definidos e isquemia hepática, caracterizada por hipocromia subcapsular no grupo 5000.

Barbosa-Ferreira et al, 2005 observaram a hipocromia hepática (isquemia) em ratos tratados com 4% de *Senna occidentalis*, planta lactescente, em ensaio de 28 dias.

Hipotetizamos que os achados histológicos observados pelo uso do jaracatiá em diferentes doses, provavelmente devem-se ao fato do fruto possuir a presença de antraquinonas no látex, comum também no gênero *Solanum*. Holstege (2005) demonstra em plantas do gênero *Solanum* a inibição das enzimas hepáticas microssomias causando hemólise em exposições aguda ou por curto prazo.

antraquinonas têm demonstrado serem hepatoprotetoras em baixas dosagens (doses terapêuticas), porém demonstram efeitos hepatotóxicos com a utilização de doses progressivas (Wang et al, 2011)

As análises histológicas do baço do grupo controle demonstraram congestão vascular discreta em 20% dos animais com preservação da polpa branca e da celularidade normal na polpa vermelha (Tabela 4). Nos grupos tratados a frequência de congestão vascular (Figura 2F) foi maior em animais do grupo 500014D e similares ao grupo controle nos demais animais. Adicionalmente foi observado em grupos tratados aumentos do número de megacariócitos, sendo destacada nos grupos 5000 e 5000CZ. No grupo 500014D a presença de megacariócitos é menos frequente, sugerindo reversão na retirada do EJIN, potencial agente estimulador. Observou-se ainda em

polpa branca desorganizada em animais do grupo 5000CZ e em maiores proporções no grupo 500014D, não sendo observada em animais do grupo 5000.

A presença de megariócitos no baço pode estar relacionada à mecanismos de compensação após trombocitopenia (Machlus e Italiano, 2013). Em nossos achados observamos um quadro de trombocitose (tabela 2), hipotetizamos que seja reativa, secundária à trombocitopenia.

Barbosa-Ferreira et al (2005) verificaram redução da polpa branca do baço de ratos adultos, tratados com baixas concentrações de sementes de *Senna occidentalis* (até 1%), concluindo toxicidade.

Concluí-se que na utilização do EJIN e EJC em ensaios subcrônico de 28 dias há alterações semelhantes para ambos os produtos utilizados. Apesar de algumas reversibilidades das alterações terem sido percebidas, como peso de estômago e aumento no número megacariócitos. O aumento no peso relativo do fígado, em grupo satélite, em conjunto com a alteração da glicose e do colesterol, representam em conjunto achados que indicam modificações tardias relevantes em animais que utilizam o extrato do fruto de forma subcrônica em doses elevadas.

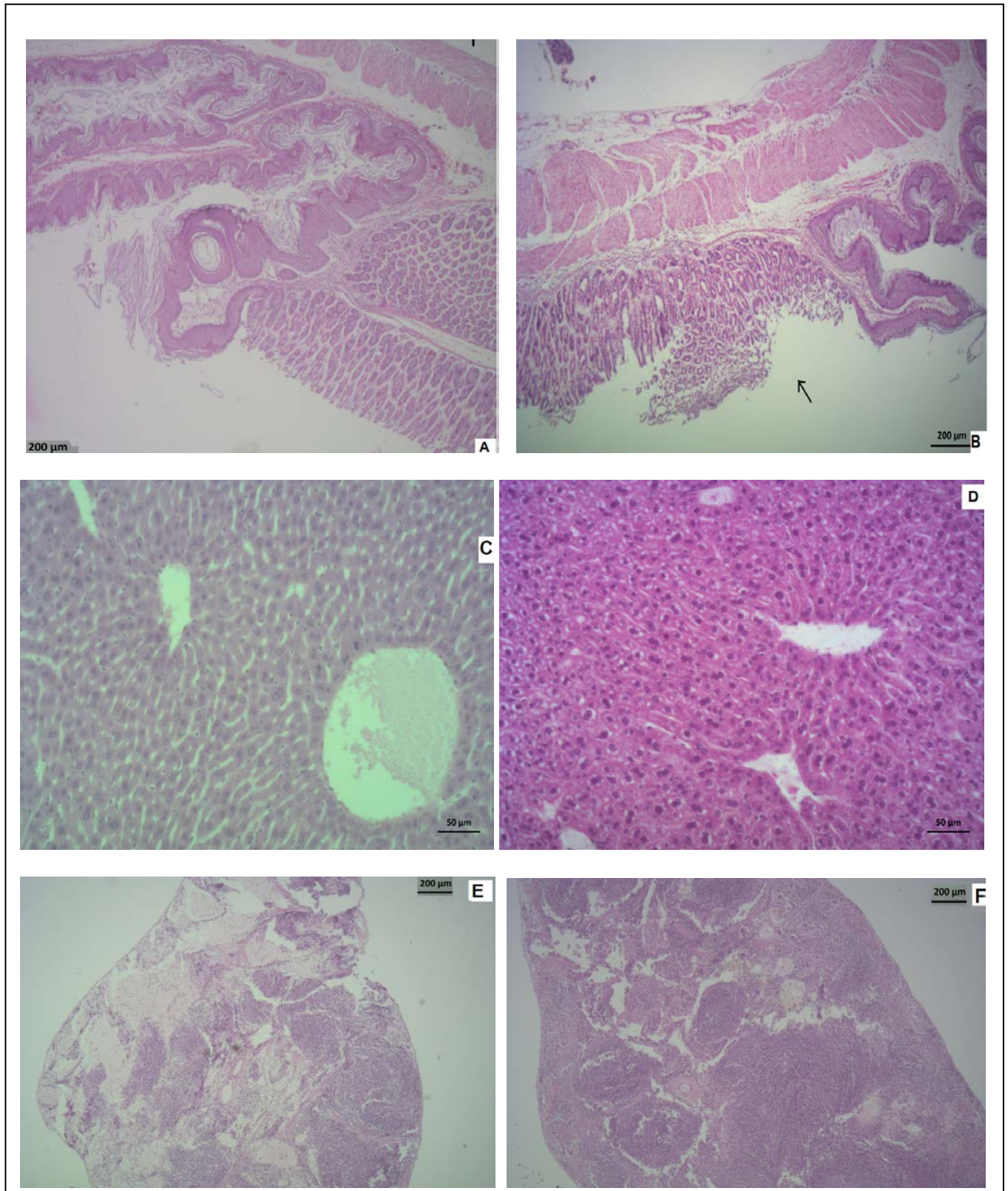


Fig2 Fotomicrografias do ensaio subcrônico com camundongos *Swiss*: estômago grupo controle (A) e estômago grupo tratado(B) fígado grupo controle(C) e fígado grupo tratado(D) baço grupo controle(E) e baço grupo tratado(F), com 5000 mg/kg/dia de extrato de *Jaracatiá spinosa*.

Tabela 4

Alterações histológicas em órgãos de camundongos Swiss machos tratados com extrato de *jaracatia spinosa* por 28 dias, e grupo satélite.

Estômago	Controle	5000	5000CZ	500014D
Infiltrado Inflamatório	-	1+ 20%	1+ 20%-	1+ 20%
Mucosa Gástrica Afetada	20%	60%	40%	40%
Cárdia Afetada	-	-	40%	40%
Fígado				
Congestão Vascular	1+ 40%	1+ 60% 2+ 20%	1+ 60%	1+ 40% 2+ 40%
Hepatócitos Vacuolizados		1+ 20%	1+ 40%	1+ 20%
Hepatócitos Mal Definidos	-	-	20%	60%
Sinusóides Mal Definidos	-	20%	-	40%
Hipocromia Subcapsular	-	20%		
Intestino jejuno				
MALT bem desenvolvido			2+20%	20%
Baço				
Congestão Vascular	1+ 20%	1+ 20%	1+ 20%	1+ 40%
Aumento de Megacariócitos	-	1+ 20%	1+ 80%	1+ 20%
Polpa Branca Desorganizada		-	20%	40%
Polpa Branca Hiper celularizada	-	-	20%	40%
Pulmão				
Congestão Vascular	-	1+ 20% 2+ 20%	1+ 40%	1+ 40%
Infiltrado Inflamatório	-	1+ 40%	1+ 60%	1+ 20%
Espessamento Alveolar	20%	60%	100%	40%
Granulomas	-	-	-	-
Secreção Bronquiolar	-	-	20%	20%
Rim				
Congestão Vascular	-	1+ 100%	1+ 80%	1+ 80% 2+20%

Frequência de aparecimento de alterações histopatológicas.

5 animais por grupo (controle, 5000 e 5000cz) e 5 machos no grupo satélite (500014)

Escores: - Ausente; 1+ Discreto; 2+ Moderado; 3+ Intenso

9.5 Referências

- Abreu, H., 2015. Estudo nutricional, fitoquímico e biológico do “jaracatiá” (*Jacaratia spinosa* (Aubl) A. DC). Dissertação (mestrado) : Curitiba
- Aguiar, F. L.; Almeida, C. A.; Camargos, L. S. A Caracterização Bioquímica Da Composição Do Cerne De Jaracatiá (*Jacaratia spinosa*). Acta Iguazú. Cascavel, v.1, n.4, p. 65 - 71, 2012
- Almança, C.C.J., Saldanha, S.V., Sousa, D.R., Trivilin, L.O., Nunes, L.C., Porfírio, L.C., Marinho, B.G., 2011. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. J. Ethnopharmacol. 138, 508–512. doi:10.1016/j.jep.2011.09.045
- Association of official analytical chemistry (A.O.A.C), 2005. Methods of analysis of the association of official analytical chemists, 13 Ed. Arlington.
- Badillo, V.M. Monografía de la familia Caricaceae. Asociación de profesores, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay. 1971.
- Barbosa-Ferreira, M., Dagli, M.L.Z., Maiorka, P.C., Górniak, S.L., 2005. Sub-acute intoxication by *Senna occidentalis* seeds in rats. Food Chem. Toxicol. 43, 497–503. doi:10.1016/j.fct.2004.11.017
- Bleeker, J.S., Hogan, W.J., Bleeker, J.S., Hogan, W.J., 2011. Thrombocytosis: Diagnostic Evaluation, Thrombotic Risk Stratification, and Risk-Based Management Strategies. Thromb. 2011, e536062. doi:10.1155/2011/536062
- Boudreau, M.D., Beland, F.A., Nichols, J.A., Pogribna, M., 2013. Toxicology and carcinogenesis studies of a nondecolorized [corrected] whole leaf extract of *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water study). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 1–266.
- Brasil. Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2008.
- Corrêa, P. M.; Pena, L. de A., 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro.
- Damy, S.B., Camargo, R.S., Chammas, R., Figueiredo, L.F.P. de, 2010. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. Rev. Assoc. Médica Bras. 56, 103–111. doi:10.1590/S0104-42302010000100024
- Dharmarathna, S.L.C.A., Wickramasinghe, S., Waduge, R.N., Rajapakse, R.P.V.J., Kularatne, S.A.M., 2013. Does *Carica papaya* leaf-extract increase the platelet count? An experimental study in a murine model. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3, 720–724. doi:10.1016/S2221-1691(13)60145-8.
- Food and Drug Administration- FDA. 2007. Toxicological Principles for the safety assessment of food Ingredients. e-book, Available: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/Redbook/default.htm> accessed on:

25.06.2015

- Hoehne, F. C., 1946. Frutas Indígenas. Instituto de Botânica; Publicação da série “D”, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio. São Paulo.
- Holstege, C.P. “Solanum genus.” In Wexler P (ed): Encyclopedia of Toxicology. 2nd Edition. Elsevier Ltd, Oxford, UK. 2005;4:66.
- Hor, S.Y., Ahmad, M., Farsi, E., Yam, M.F., Hashim, M.A., Lim, C.P., Sadikun, A., Asmawi, M.Z., 2012. Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): acute and subchronic toxicity studies. Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP 63, 106–114. doi:10.1016/j.yrtph.2012.03
- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). 2004. Mapa de Biomas do Brasil e de Vegetação. Brasília.
- Khoo, Z.Y., Teh, C.C., Rao, N.K., Chin, J.H., 2010. Evaluation of the toxic effect of star fruit on serum biochemical parameters in rats. Pharmacogn Mag 6, 120–124. doi:10.4103/0973-1296.62899
- Kinupp, V. F; Lorenzi, H. 2014. Plantas Alimentícias não-convencionais no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. Ed. Plantarum. Nova Odessa-Sp.
- ³Luyong ,Z., Zhenzhou ,J., Cunhai , P.; Ming,Y. 2004. Six-month oral toxicity study of total anthraquinone in radix et rhizoma rhei in SD rats. Europe PMC, 25 (4):206-209
- Malone, m. H; Robichaud, r. C. The pharmacological evaluation of natural products general and pecificapproaches to screening ethnopharmaceuticals. J Ethnopharmacol, v. 8, p. 127-147, 1983.
- Martinez- Crovetto, R. La alimentación entre los indios guaranies de Misiones (Republica Argentina). Etnobiologia. Corrientes,n.4,p.1-24, 1968.
http://ibone.unne.edu.ar/objetos/uploads/documentos/bonplandia/public/6_2/83_91.pdf
- Matsuda, Y., Yokohira, M., Suzuki, S., Hosokawa, K., Yamakawa, K., Zeng, Y., Ninomiya, F., Saoo, K., Kuno, T., and Imaida, K. (2008). One-year chronic toxicity study of Aloe arborescens Miller var. natalensis Berger in Wistar Hannover rats. A pilot study. Food Chem. Toxicol. 46, 733-739.
- ⁴Montrucchio,D.P. 2012. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcalóide S-(+)-dicentrina extraído de frutos de Ocotea puberula (Lauraceae). Tese (Doutorado em farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- Organisation for Economic Cooperation and Development.2001. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris.
- Organisation for Economic Cooperation and Development. 2008. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents,Paris.
- Próspero, E. T. P. 2010. Caracterização da fruta Jacaratiá spinosa e processamento do doce de jaracatiá em calda com avaliação da estabilidade. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Restell, T.I., Porfirio, L.C., Souza, A.S. de, Silva, I.S., 2014. Hematology of Swiss mice

- (*Mus musculus*) of both genders and different ages. *Acta Cirúrgica Bras. Soc. Bras. Para Desenvolv. Pesqui. Em Cir.* 29, 306–312.
- Rose, S.R., Petersen, N.J., Gardner, T.J., Hamill, R.J., Trautner, B.W., 2012. Etiology of thrombocytosis in a general medicine population: analysis of 801 cases with emphasis on infectious causes. *J. Clin. Med. Res.* 4, 415–423. doi:10.4021/jocmr1125w
- Silva, R. O.; Andrade VM, Bullé Rêgo ES., 2015. Avaliação da Toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 170, 2015. p. 66 -71
- Souza, G.S. 1938. Tratado descritivo do Brasil em 1587. 3 ed. Companhia editora Nacional e Editora da USP. São Paulo.
- Thrall, M.A. 2015. Veterinary Hematology and Biochemistry . 2 Ed. Roca, São Paulo.
- Tropicos.org. *Jacaratia spinosa* (Aubl.) A. DC. Jardim Botânico de Missouri. Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 8063110. 2013. Available: <<http://www.tropicos.org/Name/6100046>>. Accessed on: 02.02.2015.
- UNECE – United Nations Economic Commission for Europe. 2011. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). <http://www.Unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-A C10-3 0- Rev4e.pdf> (accessed 08.09.15.).
- Voss, K.A., Brennecke, L.H., 1991. Toxicological and hematological effects of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) seeds in Sprague-Dawley rats: a subchronic feeding study. *Toxicon* 29, 1329–1336.
- Wang, J., Zhao, H., Zhao, Y., Jin, C., Liu, D., Kong, W., Fang, F., Zhang, L., Wang, H., Xiao, X., 2011. Hepatotoxicity or Hepatoprotection? Pattern Recognition for the Paradoxical Effect of the Chinese Herb *Rheum palmatum* L. in Treating Rat Liver Injury. *PLOS ONE* 6, e24498. doi:10.1371/journal.pone.0024498
- World Health Organization. 2000. Guidelines for the preparation of toxicological working papers for the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – Geneva, 2000.

10 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados da toxicidade aguda do EJIN demonstraram que a DL50 está acima de 5000 mg/kg, sugerindo baixa toxicidade oral do fruto. Em ensaio subcrônico foram observados efeitos dose-resposta para parâmetros tais como, número de bolos fecais, piloereção, aumento no peso relativo do estômago e elevação da contagem do número de plaquetas em ambos os gêneros, dentre outros. Alterações bioquímicas e histológicas também foram observadas, principalmente em estômago, fígado e baço, inclusive em grupo satélite. Modificações que em conjunto com demais achados representam alterações relevantes em animais que consumiram EJIN e EJC.

Portanto, a avaliação da toxicidade subcrônica sugere que o *Jaracatiá spinosa* deve ser consumido com precaução.

Estudos com dosagens menores em ensaio crônico são sugeridos, a fim de aproximar o ensaio ao consumo de algumas comunidades.